



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
Centro de Ciências Exatas e da Natureza - CCEN
Departamento de Química - DQ
Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ



TESE DE DOUTORADO

**Ftalocianinas metálicas como mediadores de elétrons
para determinação voltamétrica de ácido tartárico e
aminas biogênicas em vinhos**

Anabel Santos Lourenço

SAPIENTIA AEDIFICAT

**João Pessoa – PB – Brasil
Julho/2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
Centro de Ciências Exatas e da Natureza - CCEN
Departamento de Química - DQ
Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ



TESE DE DOUTORADO

Ftalocianinas metálicas como mediadores de elétrons para determinação voltamétrica de ácido tartárico e aminas biogênicas em vinhos

Anabel Santos Lourenço*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração Química Analítica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

COORIENTADOR: Prof. Dr. Williane Farias Ribeiro

* Bolsista:



**João Pessoa – PB – Brasil
Julho/2020**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L892f Lourenco, Anabel Santos.

Ftalocianinas metálicas como mediadores de elétrons para determinação voltamétrica de ácido tartárico e amins biogênicas em vinhos / Anabel Santos Lourenco. - João Pessoa, 2020.

93 f. : il.

Orientação: Mário César Ugulino de Araújo.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. ftalocianinas metálicas. 2. eletrodo de pasta de carbono. 3. ácido tartárico. 4. amins biogênicas. 5. vinhos. I. Araújo, Mário César Ugulino de. II. Título.

UFPB/BC

Ftalocianinas metálicas como mediadores de elétrons para determinação voltamétrica de ácido tartárico e aminos biogênicas em vinhos

Tese de Doutorado apresentada pela aluna Anabel Santos Lourenço e aprovada pela banca examinadora em 20 de julho de 2020.



Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Willame Farias Ribeiro
2º. Orientador



Profª. Drª. Maria Mônica Lacerda Martins Lúcio
Examinadora



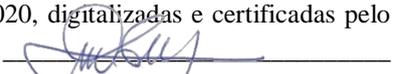
Profª. Drª. Edilene Dantas Teles Moreira
Examinadora



Profª. Drª. Kátia Messias Bichinho
Examinadora



Profª. Drª. Liliana de Fátima Bezerra Lira Pontes
Examinadora



À minha mãe por todo amor,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a **Deus** todo-poderoso por me fortalecer a cada dia e guiar meu caminho com tanta luz, agradeço até mesmo pelos dias difíceis, pois esses me deixaram ainda mais forte para conseguir chegar até aqui.

À minha família, minha mãe **Sebastiana Maria**, por se fazer presente em minha vida mesmo que distante, por entender minha ausência nos momentos mais importantes e por me encorajar todos os dias. A meu pai, **José Lourenço** por todo amor, compreensão e paz transmitida. À minha irmã **Ana Paula**, por todo apoio ao longo dessa caminhada e ao meu sobrinho **Théo**, pela alegria, amor e carinho.

A meus avós (in memorian), **Maria de Medeiros** e **Francisco Lourenço**, por todo amor e carinho.

À **Amanda Cecília** por toda força, apoio e incentivo durante essa jornada. Grata também pelas valiosas e significantes contribuições para o desenvolvimento desse trabalho.

A meu cachorro **Luck**, pela companhia e por todo amor.

Aos familiares (tios, tias, primos e primas mais próximos) pelo apoio e carinho.

A meu orientador, Prof. Dr. **Mário Ugulino**, pela orientação e apoio durante todos esses anos.

A meu coorientador, Prof. Dr. **Williame Farias**, pelas conversas e ensinamentos.

A todos que fazem parte do **LAQA** – (Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria) que de alguma forma contribuiu para minha formação.

Aos amigos acadêmicos, **Emanuella, Mayara, Welma, Adriano, David, Valber, Licarion, Paulo, Kevla, Wellington, Stefani** e **Flaviano** pelas conversas e apoio diário, tornando o convívio no laboratório mais leve e prazeroso.

Aos meus amigos, **Jefferson** e **Cícero**, pelas conversas, momentos de descontração e amizade.

As Professoras que fizeram parte da banca de qualificação e defesa final, Prof^ª Dr^ª **Kátia Bichinho**, Prof^ª Dr^ª **Liliana Pontes**, Prof^ª Dr^ª **Edilene Dantas** e Prof^ª Dr^ª **Mônica Lúcio**, pela valiosas contribuições e ensinamentos.

Ao PPGQ-UFPB e a CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT.....	XIV
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1 VINHOS	19
2.1.1 ÁCIDO TARTÁRICO	21
2.1.2 TRIPTAMINA E HISTAMINA.....	22
2.2 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS	24
2.3 FTALOCIANINAS	25
2.3.1 USO DE MPCs COMO MEDIADORES DE ELÉTRONS.....	29
2.4 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS.....	32
2.5 TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS.....	34
2.5.1 MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS DESDOBRADOS COM BILINEARIZAÇÃO RESIDUAL (U-PLS/RBL).....	36
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 EXPERIMENTAL	41
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	41
4.2 INSTRUMENTAÇÃO E PROGRAMA DE CONTROLE	41
4.3 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO	42
4.4 PROCEDIMENTO ELETROQUÍMICO.....	43
4.5 CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO	43
4.6 AMOSTRAS DE VINHOS E ESTUDO DE RECUPERAÇÃO	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 COMPORTAMENTO REDOX DO TA EM MPCs – CPE E CPE	46
5.2 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO CoPC – CPE E DO H ₂ PC – CPE	47
5.3 INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DO TA	48

5.4	ESTUDO DE VELOCIDADE.....	49
5.5	INFLUÊNCIA DA FREQUÊNCIA SOBRE A RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DO TA.....	50
5.6	CURVA ANALÍTICA.....	51
5.7	INTERFERENTES	52
5.8	ESTUDOS QUIMIOMÉTRICOS.....	53
5.8.1	PRÉ-TRATAMENTO DOS DADOS	53
5.8.2	MODELAGEM U-PLS/RBL.....	54
5.8.3	ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE VINHO	57
5.8.4	ESTUDO DE RECUPERAÇÃO	58
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
7	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
8	EXPERIMENTAL	63
8.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	63
8.2	INSTRUMENTAÇÃO E PROGRAMA DE CONTROLE.....	63
8.3	PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO	63
8.4	PROCEDIMENTO ELETROQUÍMICO.....	64
8.5	INTERFERENTES	65
8.6	AMOSTRAS DE VINHO E ESTUDO DE RECUPERAÇÃO	65
9	RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
9.1	COMPORTAMENTO REDOX DAS AMINAS EM MPCs – CPE E CPE... ..	66
9.2	COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO NiPC – CPE	67
9.3	INFLUÊNCIA DA PERCENTAGEM DO MODIFICADOR	68
9.4	INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DAS ABs.....	69
9.5	ESTUDO DE VELOCIDADE.....	70
9.6	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS	71
9.7	INTERFERENTES	71
9.8	CURVA ANALÍTICA.....	72
9.9	EFEITO DE MEMÓRIA.....	73
9.10	DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HISTAMINA E TRIPTAMINA EM AMOSTRAS DE VINHOS	74

9.11 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO	75
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
11 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICE A – RESULTADOS MCR – ALS	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas moleculares dos ácidos orgânicos presentes no vinho.....	20
Figura 2 - Estruturas moleculares das aminas biogênicas presentes em vinhos.....	21
Figura 3 - Estruturas moleculares das ftalocianinas	26
Figura 4 - Estrutura da ftalocianina substituída (R = NH ₂ , Ar-S, RO, SO ₃ , F, Cl, Br).	29
Figura 5 - Imagem do potenciostato/galvanostato Eco Chemie/Autolab.....	41
Figura 6 - Ilustração do eletrodo de pasta de carbono modificado.....	42
Figura 7 - Comportamento eletroquímico do TA em diferentes PCs – CPE	46
Figura 8 - Comportamento eletroquímico do CoPC – CPE e H ₂ PC – CPE em SWV	47
Figura 9 - Influência do pH na resposta electrocatalítica do TA (200 µmol L ⁻¹).....	48
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos de uma solução 150 µmol L ⁻¹ de TA em tampão acetato (pH 4,5) sobre CV em diferentes velocidades de varredura.....	49
Figura 11 - Estudo da frequência.....	50
Figura 12 - Curva analítica SW	51
Figura 13 - Estudo de interferentes.	52
Figura 14 - Voltamogramas SW para os dados do conjunto de calibração na frequência de 20 Hz, tampão acetato 0,05 mol L ⁻¹	53
Figura 15 - Variação de (—) S _u em função do n° de etapas RBL adicionadas para o TA tendo como referência o (—) S _{cal}	55
Figura 16 - Gráfico de concentração prevista x nominal para o TA (A) e EJCR (B) para o modelo U-PLS/RBL obtido no conjunto de validação.....	57
Figura 17 - Voltamogramas SW pré-processados de amostras de vinhos brancos (—) e vinhos tintos (.....).....	57
Figura 18 - Comportamento eletroquímico das aminas em diferentes superfícies de eletrodos em tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ , pH = 8,5	66
Figura 19 - Comportamento eletroquímico de NiPC – CPE em tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ , pH = 8,5	67
Figura 20 - Estudo da percentagem do modificador. Voltamogramas SW em meio tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ (pH = 8,5)	68
Figura 21 - Comportamento voltamétrico de aminas biogênicas sobre o NiPC – CPE em DPV com variação de pH.....	69

Figura 22 - Estudo de velocidade para Hist e Trip em voltametria cíclica e tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH = 8,5 70

Figura 23 - Estudo de interferentes 71

Figura 24 - Curva analítica obtida para diferentes concentrações de: (A) Hist (0,55 - 4,28 µg mL⁻¹) e Trip com concentração fixa de 0,16 ng mL⁻¹; (B) Trip (0,08 – 0,76 ng mL⁻¹), e Hist com concentração fixa de 1,1 µg mL⁻¹ 72

Figura 25 - Curva analítica SW 73

Figura 26 - Efeito de memória..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de concentração das misturas do conjunto de validação preparado com base no planejamento Taguchi	44
Tabela 2 – Identificação e descrição dos vinhos branco e tintos	45
Tabela 3 - Resultados da validação cruzada para o conjunto de calibração no U-PLS.....	54
Tabela 4 - Concentrações preditas e nominais ($\mu\text{mol L}^{-1}$) de TA no conjunto de validação por U-PLS/RBL.....	56
Tabela 5 - Concentrações de TA (g L^{-1}) em vinhos tintos e brancos determinados pelo método proposto	58
Tabela 6 - Estudo de recuperações de TA em vinhos usando o método proposto	59
Tabela 7 - Soluções usadas como eletrólito suporte.....	63
Tabela 8 – Parâmetros experimentais estudados	64
Tabela 9 - Identificação e descrição dos vinhos branco e tintos.....	65
Tabela 10 - Concentrações de Trip e Hist em vinhos determinadas pelo método proposto	75
Tabela 11. Estudo de recuperações das ABs em vinhos usando o método proposto	76

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABs – Aminas biogênicas

AO – Ácidos orgânicos.

AOAC – Associação oficial de Química Analítica (do inglês, *Association of official analytical Chemists*).

AsLSSR – Regressão spline dos mínimos quadrados assimétricos (do inglês, *Asymmetric least squares spline regression*).

CA – Ácido cítrico (do inglês, *citric acid*).

CoPC – Ftalocianina de cobalto (II) (do inglês, *Cobalt (II)-phthalocyanine*).

CoPC-CPE – Eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II)

COW – Alinhamento por correção otimizada (do inglês, *Correlation optimized warping*).

CPE – Eletrodo de pasta de carbono (do inglês, *Carbon paste electrode*).

CuPC – Ftalocianina de cobre (II) (do inglês, *Copper (II)-phthalocyanine*).

CuTsPc – Ftalocianina de cobre tetrassulfonada (do inglês, *Copper tetrasulfonated phthalocyanine*).

CV – Voltametria cíclica (do inglês, *Cyclic voltammetry*).

***CV** – Coeficiente de variação (Desvio padrão relativo em termos percentuais)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês, *Diferencial pulse voltammetry*).

EJCR – Região elíptica de confiança conjunta (do inglês, *Elliptical joint confidence region*).

f – Frequência de aplicação de pulso.

FePC – Ftalocianina de ferro (II) (do inglês, *Iron (II)-phthalocyanine*).

FMWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados (do inglês, *Functionalized multi-wall carbon nanotubes*).

Hist – Histamina

H₂PC – CPE - Eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina não metalizada.

I_a – Corrente direta.

I_r – Corrente reversa.

I_t – Corrente total.

LA – Ácido láctico (do inglês, *lactic acid*).

LOD – Limite de detecção (do inglês, *Limit of detection*).

LOQ – Limite de quantificação (do inglês, *Limit of quantitation*).

MA – Ácido málico (do inglês, *malic acid*)

MPC – Metaloftalocianina.

MVC2 – Calibração multivariada 2 (do inglês, *multivariate calibration 2*).

MWCNT - Nanotubos de carbono paredes múltiplas (do inglês, *Multi-wall carbon nanotubes*).

MPCs – CPE – Eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianinas metálicas

NiPC – CPE – Eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de níquel (II)

NiPC – Ftalocianina de níquel (II) (do inglês, *Nickel (II)-phthalocyanine*).

PC – Ftalocianina.

pH – Potencial hidrogênionico.

PLS – Mínimos quadrados parciais (do inglês, *Partial least square*).

PRESS – Soma quadrática dos erros de predição (do inglês, *Prediction errors sum of squares*).

REP – Erro relativo de predição (do inglês, *Relative error of prediction*).

RMSEV – Raiz quadrada dos Erros Médios Quadráticos de Validação (do inglês, *Root mean squares errors of validation*).

SA – Ácido succínico (do inglês, *succínico acid*).

SEN – Sensibilidade.

SVD – Decomposição de Valores Singulares (do inglês, *singular value decomposition*).

SWCNT - Nanotubos de parede única (do inglês, *single-wall carbon nanotubes*).

SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês, *Square wave voltammetry*).

TA – Ácido tartárico (do inglês, *Tartaric acid*).

Trip – Triptamina

U-PLS/RBL – Mínimos quadrados parciais desdobrados com bilinearização residual (do inglês, *Partial least squares unfolded with residual bilinearization*).

v – Velocidade.

ZnPC – Ftalocianina de zinco (II) (do inglês, *zinc (II)-phthalocyanine*).

γ – Sensibilidade Analítica.

ΔE_p – Amplitude de pulso.

ΔE_s – Incremento de pulso.

RESUMO

A necessidade de estudar e quantificar constituintes presentes em inúmeras matrizes justifica o desenvolvimento de métodos analíticos e o uso de eletrodos quimicamente modificados com mediadores redox. A utilização desses sensores viabiliza estudos com espécies de grande impacto, industrial, ambiental e para a saúde humana. Nesse contexto, o uso de ftalocianinas metálicas (MPCs), como mediadores de elétrons, tem sido empregado em eletroanálise por possuírem propriedades que facilitam a transferência de elétrons. O presente trabalho propôs o desenvolvimento de métodos voltamétricos utilizando eletrodos de pasta de carbono (CPE) modificados com ftalocianinas metálicas. O primeiro estudo consistiu em investigar o comportamento voltamétrico das diferentes PCs para determinação do TA em vinhos. Com esse objetivo verificou-se que apenas a ftalocianina de cobalto (II) (CoPC) é capaz de eletrocatalizar a oxidação do TA, fato que está relacionado a presença do cobalto neste complexo. Dessa forma foi desenvolvido o CoPC – CPE associado a calibração multivias para determinação de ácido tartárico (TA) em vinhos. O TA encontra-se presente no vinho em altas concentrações, e sua quantificação é de extrema importância, tendo em vista sua influência nas propriedades organolépticas, estabilidade e características microbiológicas dessa bebida. A presença de outros ácidos orgânicos no vinho impossibilitou a determinação univariada do TA, uma vez que esses ácidos apresentam sinal de resposta em potenciais muito próximo ao do TA, dessa forma foi utilizada a modelagem U-PLS/RBL, ferramenta quimiométrica capaz de quantificar um ou mais analito na presença de interferentes. O potencial de resposta e a sensibilidade variam com a mudança de pH do meio, apresentando maior sensibilidade em tampão acetato (pH = 4,5) com faixa linear de resposta de 10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 0,9991$) e LOD e LOQ de 7,29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 22,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Ainda com o estudo de vinhos, o segundo estudo propôs a determinação simultânea de aminas biogênicas (ABs), constituintes que também se encontram presentes nos vinhos e podem diminuir a qualidade dessa bebida. Além disso, essas ABs, em especial a triptamina (Trip) e histamina (Hist), apresentam elevado potencial toxicológico para a saúde humana, chegando a causar diversos sintomas de intoxicação, mesmo quando presentes em baixas concentrações. Apesar de não existir regulamentos que determinem a quantidade dessas substâncias em vinhos, o conhecimento da presença dessas espécies é de extrema importância para avaliar a qualidade do vinho e evitar a intoxicação causada pela ingestão dessa bebida. Dessa forma foi desenvolvido o CPE - NiPC para determinação simultânea de Hist e Trip em vinhos. Os estudos mostraram que, além da NiPC outras MPCs eletrocatalisa a reação de oxidação dessas aminas, entretanto apenas a NiPC contribuiu para a elevada sensibilidade do método proposto. O potencial de resposta e a sensibilidade dos dois analitos dependem do pH, obtendo respostas ótimas em tampão fosfato, pH = 8,5 com faixa linear de resposta de 0,49 – 3,93 ng mL^{-1} para Trip e 0,37 - 2,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Hist e LOD de 0,168 ng mL^{-1} e 0,038 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e LOQ de 0,509 ng mL^{-1} e 0,115 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para Trip e Hist, respectivamente. Os resultados obtidos revelaram a importância do uso das MPCs como mediadores de elétrons para a eletrocatalise das diferentes espécies químicas presentes nos vinhos.

Palavras chave: ftalocianinas metálicas, eletrodo de pasta de carbono, ácido tartárico, aminas biogênicas, vinhos.

ABSTRACT

The need to study and quantify constituents present in numerous matrices justifies the development of analytical methods and the use of chemically modified electrodes with redox mediators. The use of these sensors allows studies with species of great impact, industrial, environmental and for human health. In this context, the use of metallic phthalocyanines (MPCs), as electron mediators, has been used in electroanalysis because they have properties that facilitate the transfer of electrons. The present work proposed the development of voltammetric methods using carbon paste electrodes (CPE) modified with metallic phthalocyanines. The first study consisted of investigating the voltammetric behavior of different PCs for determining TA in wines. With this objective it was verified that only cobalt (II) phthalocyanine (CoPC) is able to electrocatalyze the oxidation of TA, a fact that is related to the presence of cobalt in this complex. In this way, CoPC - CPE was developed associated with multipath calibration for the determination of tartaric acid (TA) in wines. TA is present in wine in high concentrations, and its quantification is extremely important, considering its influence on the organoleptic properties, stability and microbiological characteristics of this drink. The presence of other organic acids in wine made it impossible to univariate the determination of TA, since these acids show a response signal in potentials very close to that of TA, thus using U-PLS/RBL modeling, a chemometric tool capable of quantifying a or more analyte in the presence of interferents. The response potential and sensitivity vary with the pH change of the medium, presenting greater sensitivity in acetate buffer (pH = 4.5) with a linear response range of 10 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 0.9999$) and LOD and LOQ of 7.29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 22.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Still with the study of wines, the second study proposed the simultaneous determination of biogenic amines (ABs), constituents that are also present in wines and can decrease the quality of this drink. In addition, these ABs, especially tryptamine (Trip) and histamine (Hist), have high toxicological potential for human health, even causing several symptoms of intoxication, even when present in low concentrations. Although there are no regulations that determine the quantity of these substances in wines, knowledge of the presence of these species is extremely important to assess the quality of the wine and to avoid intoxication caused by the ingestion of this drink. Thus, the CPE - NiPC was developed for simultaneous determination of Hist and Trip in wines. Studies have shown that, in addition to NiPC, other MPCs electrocatalyze the oxidation reaction of these amines, however only NiPC contributed to the high sensitivity of the proposed method. The response potential and sensitivity of the two analytes depend on the pH, obtaining optimal responses in phosphate buffer, pH = 8.5 with a linear response range of 0.49 - 3.93 ng mL^{-1} for Trip and 0.37 - 2.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for Hist and LOD of 0.168 ng mL^{-1} and 0.038 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and LOQ of 0.59 ng mL^{-1} and 0.115 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for Trip and Hist, respectively. The results obtained revealed the importance of using MPCs as electron mediators for the electrocatalysis of the different chemical species present in wines.

Keywords: metal phthalocyanines, carbon paste electrode, square wave voltammetric, tartaric acid, biogenic amines, wines.



Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Eletrodos quimicamente modificados têm sido cada vez mais utilizados devido à grande necessidade de determinar espécies que não apresentam eletroatividade em eletrodos sólidos convencionais ou possuem baixa sensibilidade nesses substratos. Além disso, a modificação possibilita diminuir o sobrepotencial redox de algumas espécies possibilitando a quantificação e/ou estudo eletroquímico de várias espécies em amostras ambientais, clínicas e industriais (MAFATLE E NYOKONG, 1996). A adsorção de algumas espécies indesejadas presentes nas amostras a serem analisadas leva à diminuição da sensibilidade e a precisão do método desenvolvido, no entanto este problema pode ser contornado com o uso de eletrodos quimicamente modificados (CHILLAWAR *et al.*, 2015) com ftalocianinas (PCs), por exemplo.

As ftalocianinas desempenham um papel muito importante no metabolismo de organismos vivos e também são empregadas em numerosas aplicações em química analítica por serem excelentes catalisadores eletroquímicos, o que está associado aos vários estados de oxidação decorrente de processos que ocorrem no anel aromático ou no centro metálico desses complexos (KOOS E STADEN, 2015).

O pequeno gasto de energia necessário para que as PCs sofram processos redox muito rapidamente faz com que esses complexos sejam reconhecidos como excelentes eletrocatalisadores para diversas reações eletroquímicas, atuando como mediadores de elétrons para um grande número de moléculas (ZAGAL *et al.*, 2010).

A presença de espécies indesejadas em matrizes de interesse limita o desenvolvimento de alguns métodos eletroanalíticos devido à baixa seletividade do sensor utilizado frente a amostras com alto grau de complexidade. Diante dessa limitação, a utilização de ferramentas quimiométricas tem ganhado espaço nesta área, devido à possibilidade de quantificar analitos com baixos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) em matrizes complexas (JALALVAND *et al.*, 2019).

A qualidade do vinho está relacionada, entre outros fatores, à presença de ácidos orgânicos como o málico, láctico, csuccínico e tartárico que contribuem para estabilidade química e pH (LENA *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2018). O ácido orgânico que se encontra em maior concentração é o ácido tartárico (TA) e apresenta características que contribuem diretamente com a acidez total e estabilidade dos vinhos brancos e tintos (KRITSUNANKUL *et al.*, 2009). A importância da presença do TA em vinhos, bem como sua quantificação exata e precisa e a complexidade da amostra, justificam o desenvolvimento de métodos analíticos

altamente sensíveis, de baixo custo sem que haja tratamento prévio da amostra (FERNANDES E REIS, 2006).

Outras substâncias que podem ser encontradas nos vinhos são as aminas biogênicas (ABs) que, ao contrário do TA, apresentam potencial toxicológico à saúde humana, quando ingeridas em altas concentrações além de prejudicar a qualidade da bebida (MANETTA *et al.*, 2016; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2018). As ABs entram em destaque devido seus efeitos tóxicos no organismo humano, causando intoxicação alimentar quando ingeridas em altos níveis de concentração (GUMPU *et al.*, 2014). A presença das ABs em bebidas e em produtos alimentícios impulsionou o desenvolvimento de muitos métodos analíticos para identificação e quantificação dessas substâncias (BARTOWSKY E STOCKLEY, 2011; DEGEFU *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2014). Apesar de não existir regulamentação para o monitoramento da concentração dessas substâncias em vinhos, esse conhecimento é de extrema importância para o setor de comércio de bebidas, tendo em vista que a presença dessas espécies é um indicador de que esses produtos não estão em condições para serem consumidos (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2018; SOUFLEROS *et al.*, 2007).

Diante do exposto, neste trabalho propôs utilizar eletrodos de pasta de carbono (CPE) modificados com ftalocianinas metálicas (MPCs) para eletrocatalisar reações de oxidação de TA e ABs em vinhos utilizando a voltametria de onda quadrada, visando alcançar baixos LOD e LOQ sem a utilização de métodos de preparo de amostra.

1.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar eletrodos de pasta de carbono modificados com ftalocianinas metálicas para estudar a oxidação eletrocatalítica de ácido tartárico e aminas biogênicas e quantificá-las em vinhos por voltametria de onda quadrada.



Capítulo 2
Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 VINHOS

O termo vinho vem da palavra latina *vinum*, que significa "vinho" ou "vinha". É uma bebida alcoólica produzida a partir da fermentação do mosto ou suco de uva, sem a adição de enzimas, açúcares, ácidos ou outros nutrientes. No processo de vinificação a levedura consome os açúcares da uva para produzir etanol e gás carbônico (CO₂) e durante o armazenamento uma série de perturbações químicas contribuem para o aroma, sabor e para as propriedades antioxidantes do vinho. Embora outras frutas, grãos e até mesmo mel sejam utilizados na fabricação de bebidas alcoólicas, a uva em especial produz uma bebida diversificada e quimicamente complexa. O vinho pode ser definido, simplificadamente, apenas como um suco de uva fermentado (SINGLETON, 1976; JACKSON, 2008; BSC *et al.*, 2018).

Segundo a Organização Internacional do vinho (2016), foram produzidas 75,8 milhões de toneladas de uvas, em que aproximadamente metade dessas uvas foram destinadas para produção de vinho. Nesse mesmo ano a produção mundial de vinho foi de 267 milhões de hectolitros, sendo a Itália o maior produtor mundial, produzindo 19,1% de vinho (SOHAIB *et al.*, 2018). O vinho está entre as bebidas mais populares do mundo e, segundo estudos, apresenta benefícios na redução dos riscos de doença cardíaca coronária, envelhecimento celular, função cognitiva, entre outras doenças (ALANÓN *et al.*, 2015).

A química do vinho engloba a ciência da vinificação, o cultivo da uva e a análise analítica, orgânica e física, o que permite uma melhor concepção de sabor, aroma e composição. A composição do vinho é baseada nos produtos da fermentação de levedura, compostos formados durante o armazenamento e a maturação do vinho e, principalmente, dos constituintes da uva. A concentração dos mais de 500 compostos identificados analiticamente varia de 10⁻¹ a 10⁻⁶ mg L⁻¹ (SOLEAS *et al.*, 1997).

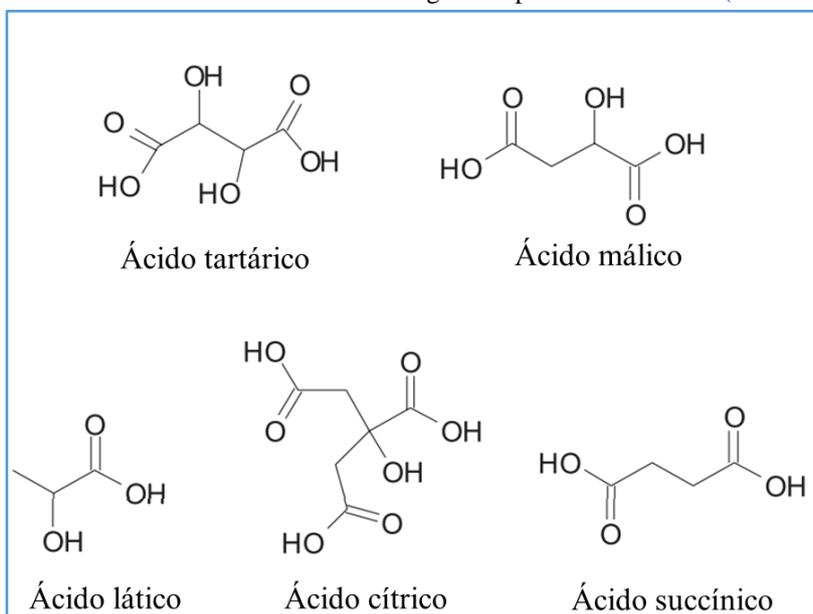
A qualidade do vinho está diretamente relacionada com fatores enológicos, incluindo tipo e estrutura da uva, fatores climáticos e técnicas de fermentação (BINDON *et al.*, 2013), bem como atributos sensoriais que são determinados pelas características químicas e físicas que contribuem para qualidade dessa bebida. Tais fatores são responsáveis pelas características organolépticas como cor, adstringência e amargor (RAPOSO *et al.*, 2018).

O vinho é uma mistura complexa de diferentes compostos, como ácidos orgânicos (AO), polifenóis, álcoois entre outros (MARTI *et al.*, 2012). Os AOs (**Figura 1**) pertencem

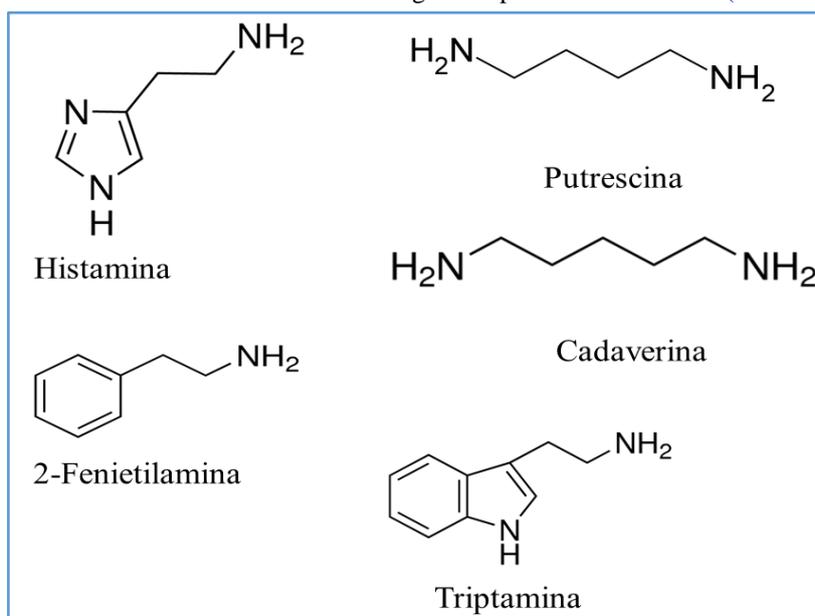
aos componentes mais importantes que completam o caráter geral e influenciam na estabilidade, sabor, aroma, cor e pH das uvas e dos vinhos (LENA *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2018). Os ácidos tartárico (TA), málico (MA) e cítrico (CA) são os principais ácidos das uvas, enquanto que o láctico (LA), succínico (SA) e acético são provenientes da fermentação alcoólica (IVANOVA-PETROPULOS *et al.*, 2018).

A concentração desses compostos é parâmetro importante em relação ao processamento dos vinhos, sendo que o TA, o MA e o LA influenciam diretamente no gosto, na estabilidade química e no pH (LENA *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2018). É de extrema necessidade a análise quantitativa de tais ácidos para o controle de qualidade dos vinhos, tendo em vista que alterações no teor destes compostos refletem na qualidade dessa bebida (MONTEIRO *et al.*, 2018). Durante o crescimento e amadurecimento das uvas, o teor desses ácidos no vinho está relacionado à região, clima e ao solo. Portanto, vale ressaltar que os vinhos das regiões mais quentes contêm mais TA (MATO *et al.*, 2005).

Figura 1 - Estruturas moleculares dos ácidos orgânicos presentes no vinho (LIMA *et al.*, 2010)



Além da presença dos AO nos vinhos, outros constituintes podem ser encontrados em quantidades elevadas diminuindo a qualidade desta bebida, dentre essas espécies podemos citar as ABs, a exemplos da triptamina (Trip), cadaverina, putrescina, histamina (Hist) e 2-feniletilamina (**Figura 2**), que são formadas durante a fermentação de mosto por leveduras e bactérias lácticas (MANETTA *et al.*, 2016; PAPAGEORGIU *et al.*, 2018).

Figura 2 - Estruturas moleculares das aminas biogênicas presentes em vinhos (SARKADI, 2017).

A presença dessas aminas é devido à descarboxilação enzimática de aminoácidos livres e outros processos metabólicos presentes nos alimentos (GUMPU *et al.*, 2014). Até o presente momento, no Brasil, ainda não foram estabelecidos limites que regulamentam essas substâncias em vinhos. No entanto, essas aminas podem ser responsáveis por efeitos toxicológicos indesejáveis como cefaleia, desconforto respiratório, palpitações cardíacas, hipotensão, hipertensão e náusea (MANETTA *et al.*, 2016).

2.1.1 ÁCIDO TARTÁRICO

Encontrado naturalmente em diversas frutas, principalmente nas uvas, possui grande importância na indústria alimentícia e de bebidas como produtos derivados de uva, bem como sucos e vinhos. O TA (ácido 2,3-dihidroxibutanodioico) é o principal AO dos vinhos tintos e brancos, apresenta baixo peso molecular e pode ser encontrado dentro da faixa de concentração de 1,5 a 4,0 g L⁻¹ (IVANOVA-PETROPULOS *et al.*, 2018; LOURENÇO *et al.*, 2018). Para o vinho, o TA desempenha um importante papel na acidez total e estabilidade, sendo este o principal componente para o controle de qualidade do produto (KRITSUNANKUL *et al.*, 2009). É um AO diprótico, cristalino e branco e encontra muitas aplicações como agente de acidificação, antioxidante, intensificador de sabor, dentre outras, na indústria vinícola, alimentar, panificação e farmacêutica (IVANOVA-PETROPULOS *et al.*, 2018 e KONTOGIANNOPOULOS *et al.*, 2016).

Nos vinhos, a concentração desse ácido permanece relativamente constantes durante o processo de vinificação. No entanto, durante o processo de fermentação o TA precipita na forma de tartaratos, essencialmente como hidrogenotartarato de potássio e em concentrações mais baixas, como tartarato de cálcio, fazendo com que a concentração de TA diminua, conferindo uma maior instabilidade aos vinhos engarrafados (IVANOVA-PETROPULOS *et al.*, 2018; KONTOGIANNOPOULOS *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A quantidade de TA no vinho permite monitorar um importante parâmetro de controle da qualidade, que é sua acidez (MATO *et al.*, 2005). Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas e simples para determinação deste ácido nos vinhos.

O método de referência para determinação de TA, recomendado pela Associação de Química Analítica Oficial (AOAC), baseia-se na titulação, seguida de uma precipitação, decorrendo, em média, 15 h de reação (AOAC, 1975). Outro método de referência que também tem sido utilizado é o da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), que também é baseado em uma reação de precipitação com um período de incubação de 12 h, seguido de filtração, lavagem e secagem a 70 °C até massa constante (AOAC, 1975). Outros métodos têm sido propostos, nos quais incluem-se os procedimentos baseados em cromatografia (FLORES *et al.*, 2012; KRITSUNANKUL *et al.*, 2009; PÉREZ-RUIZ *et al.*, 2004), eletroforese capilar (GOLUBENKO *et al.*, 2012) e sistemas multicomutados de análise em fluxo (FERNANDES & REIS, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Estudos recentes mostram o desenvolvimento de métodos utilizando eletrodos de carbono vítreo, onde um dos trabalhos reporta o uso de nanopartículas de ouro e grafeno (SONG *et al.*, 2012) e outro utilizou nanofio de germanato de cobre II (CAI *et al.*, 2012) para modificação do substrato e posterior determinação do TA. O fato desse ácido não ser eletroativo em eletrodos convencionais torna escasso o desenvolvimento de métodos voltamétricos para determinação deste ácido, impondo assim, a necessidade do uso de eletrodos modificados para o desenvolvimento de tais métodos de análise.

2.1.2 TRIPTAMINA E HISTAMINA

Nos últimos anos têm crescido os estudos acerca da presença de ABs em vinhos, onde são encontrados níveis de concentração relativamente baixos no final da fermentação alcoólica, podendo aumentar durante a fermentação malolática e o envelhecimento, além

disso, a presença de álcool nessa bebida pode aumentar a atividade tóxica das aminas, pois inibe a ação da enzima monoamina oxidase (POLO *et al.*, 2011; LANDETE *et al.*, 2011)

Segundo a literatura, a concentração de ABs nos vinhos tintos é maior que a encontrada nos vinhos brancos, porém a concentração máxima desses constituintes em qualquer vinho é de 50 mg L⁻¹, dependendo de sua qualidade (MILHEIRO *et al.*, 2019; PAPAGEORGIU *et al.*, 2018). Esses compostos apresentam estrutura alifática (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromática (tiramina e feniletilamina) e heterocíclica (triptamina e histamina) (MILHEIRO *et al.*, 2019)

Produzida enzimaticamente pela descarboxilação da histidina na presença da descarboxilase microbiana, a Hist (1H-imidazole-4-etanamina) é uma amina primária heterocíclica, de baixo peso molecular. É também produzida através da ação bacteriana durante o processamento e armazenamento de alimentos como peixe, queijo e carne processada e bebidas como cervejas e vinhos, podendo estar presente em quantidades substanciais nesses produtos (DEGEFU *et al.*, 2014 e GUMPU *et al.*, 2014).

No corpo humano, a Hist é um importante mediador em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo neurotransmissão e inúmeras funções cerebrais, secreção de alguns hormônios, regulação das funções gastrointestinais e circulatórias, e reações inflamatórias (STOJANOVIĆ *et al.*, 2016). O envenenamento pela ingestão dessa substância é decorrente de altos níveis de concentração desta substância nos alimentos e bebidas. Em contrapartida, a deficiência dessa amina no organismo pode causar distúrbios neurológicos e físicos (GETO *et al.*, 2014). A ingestão de Hist a um nível superior a 2,7 mg kg⁻¹ de peso corporal causa a intoxicação do indivíduo, que pode apresentar sintomas como dor de cabeça, náusea, vômito, diarreia, coceira, sensação de queimação oral, erupção cutânea vermelha e hipotensão, sendo esses sintomas interrompidos com o uso de anti-histamínicos (DEGEFU *et al.*, 2014; GETO *et al.*, 2014).

A triptamina é produzida por meio da descarboxilação do triptofano ou por transaminação de aldeídos e cetonas e é um precursor da serotonina, que atua no sistema nervoso central e no trato intestinal. É encontrada em algumas frutas, carnes, queijos e bebidas, tais como o vinho (COSTA *et al.*, 2016). Essa amina, quando presente em altas concentrações pode aumentar a pressão arterial e causar enxaquecas, além disso, a Trip pode aumentar a toxicidade da Hist por inibição de enzimas desintoxicantes de Hist, fato este que aumenta o risco de intoxicação, uma vez que, normalmente essas aminas encontram-se juntas em alimentos e bebidas. Apesar do impacto causado pela presença dessa amina, não

há nenhum regulamento que controle o teor em produtos de consumo humano (RIO *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2005).

A presença destas ABs em produtos alimentícios e bebidas e seu potencial toxicológico impulsionou o desenvolvimento de muitos métodos analíticos para sua quantificação, permitindo o conhecimento sobre sua presença em bebidas alcoólicas, com destaques para os vinhos (BARTOWSKY E STOCKLEY, 2011; DEGEFU *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2014), por ser uma das bebidas mais consumidas em todo mundo. O desenvolvimento desses métodos é de extrema importância para o controle de qualidade dos vinhos. Em contrapartida, até o momento não há nenhuma regulamentação que controle o teor dessas aminas em bebidas alcoólicas. Sendo assim, a fim de minimizar os efeitos causados por essas substâncias, alguns países recomendam um limite máximo de Hist em vinhos, a Suíça - 10 mg L⁻¹, Alemanha - 2 mg L⁻¹, Bélgica - 5 mg L⁻¹ e França - 8 mg L⁻¹ (PAPAGEORGIU *et al.*, 2018; SOUFLEROS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2005), já para a Trip não é possível encontrar regulamento que estabeleça limites máximos para sua concentração.

Há relatos na literatura de trabalhos utilizando eletrodos modificados com diferentes espécies, como porfirinas, nanotubos de carbono dentre outros para determinação de aminas biogênicas (BHARGAVI *et al.*, 2014; GETO *et al.*, 2014; IORDACHE *et al.*, 2018; STOJANOVIĆ *et al.*, 2016) no entanto, até o presente momento não foi encontrado nenhum estudo de determinação simultânea desses compostos por técnicas voltamétricas utilizando eletrodo modificado com MPCs. Os eletrodos quimicamente modificados com metaloftalocianinas abriram espaço para uma nova abordagem para detecção de ABs com baixos LOD e LOQ, tornando possível a aplicação analítica em amostras com baixas concentração desses constituintes sem a necessidade de tratamento prévio da amostra.

2.2 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

A reação redox desejada em um eletrodo convencional, muitas vezes envolve uma cinética de transferência de elétrons muito lenta, fazendo com que a reação ocorra em potenciais altos, que dependendo do substrato utilizado não é possível observar a resposta voltamétrica dessa reação. No entanto, diferentes espécies, conhecidas como mediadores de elétrons, podem ser incorporadas à superfície do eletrodo de trabalho, facilitando a transferência de elétrons entre o analito e o substrato. Assim, a transferência de elétrons ocorre entre o eletrodo de trabalho e o mediador e não diretamente entre o eletrodo e o analito (FAGAN-MURPHY *et al.*, 2015; WANG, 2006). Dessa forma, os eletrodos quimicamente

modificados (EQMs) têm sido extensivamente utilizados com o intuito de estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução (FAGAN-MURPHY *et al.*, 2015). O uso destes eletrodos apresenta melhoras significativas em relação ao eletrodo base, tais como propriedades eletroquímicas/eletrocatalíticas, sensibilidade, seletividade e redução do sobrepotencial de oxidação ou redução de algumas espécies. Dessa forma, o uso desses materiais facilita as reações eletroquímicas dos analitos (CHILLAWAR *et al.*, 2015; FAGAN-MURPHY *et al.*, 2015).

A modificação pode ser feita por ligação covalente, adsorção do agente na superfície do eletrodo ou por mistura do modificador e o material condutor, tais modificações apresentam eletroatividade e agem como mediadores de elétrons na interface eletrodo/solução (FAGAN-MURPHY *et al.*, 2015; SKOOG *et al.*, 2005). É imprescindível a escolha do substrato a ser modificado, pois este deve apresentar características eletroquímicas favoráveis ao método de modificação (JAHANBANI E BENVIDI, 2016). Eletrodos de metais e à base de carbono são frequentemente utilizados para se fazer a modificação com diferentes compostos químicos visando aplicações analíticas (SHARMA *et al.*, 2018).

Entre os substratos utilizados para modificação, destacam-se os eletrodos à base de carbono, por apresentar baixo custo, rápida cinética de transferência de elétrons, ampla janela de potencial, baixa corrente de fundo, inércia química e estabilidade, tornando-os adequados para este fim (SHARMA *et al.*, 2018). Vale ressaltar, que os CPE são os únicos que podem ser produzidos em uma grande variedade de tamanhos, além da facilidade de modificação, podendo ser modificados pela mistura direta do modificador com o pó de carbono e o aglutinante (NÚÑEZ *et al.*, 2018; ZAIB *et al.*, 2015).

Os mediadores de elétrons podem ser espécies orgânicas, inorgânicas, enzimáticas, entre outras, as quais contribuem significativamente para o aumento da corrente de pico, resultando em menores limites de detecção (RAVICHANDRAN E BALDWIN, 1981; SVANCARA *et al.*, 2001). Entre estas espécies, destacam-se as MPCs, que têm despertado grande interesse em estudos eletrocatalíticos.

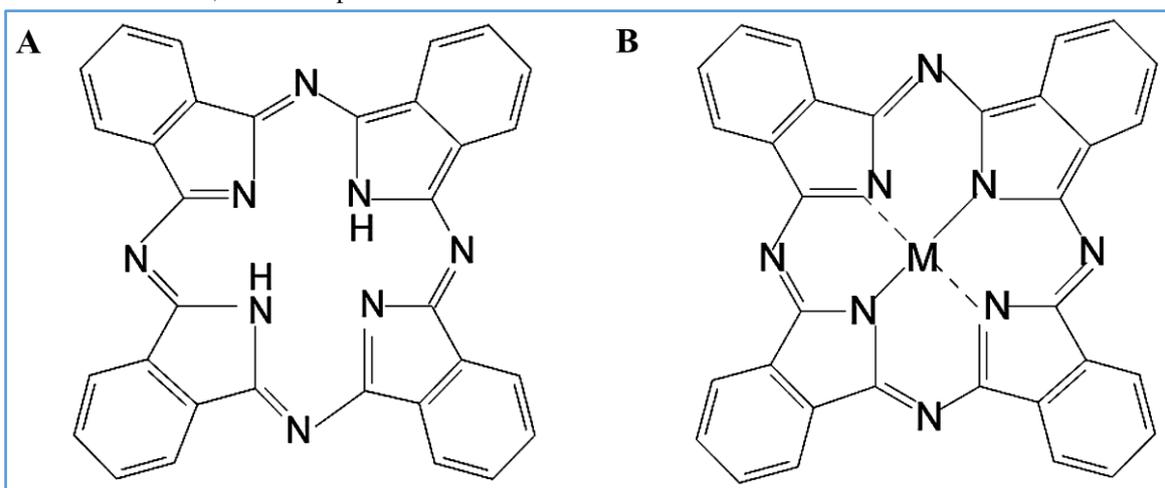
2.3 FTALOCIANINAS

Em 1907, Braun e Tcherniac obtiveram, acidentalmente, um composto que apresentava coloração azul a partir do subproduto da preparação da orto-cianobenzamida, composto esse que foi nomeado posteriormente como ftalocianina (PC) (LOMAX, 2008).

Em geral, esses compostos apresentam coloração azul ou verde e as PCs não substituídas possuem baixa solubilidade em água e em alguns solventes orgânicos (LOMAX, 2008; ÖZÇEŞMECI *et al.*, 2013).

Esses complexos possuem estrutura planar semelhante às porfirinas, são heterocíclicos aromáticos que consistem em quatro anéis de isoindol unidos por átomos de nitrogênio e dois átomos centrais de hidrogênio (H₂PC, **Figura 3A**) podendo ser substituídos por metais de transição, os quais dão origem às MPCs (JEONG *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017; ZHONG *et al.*, 2013), **Figura 3B**.

Figura 3 - Estruturas moleculares das ftalocianinas. (A) Molécula na forma ácida (H₂PC). (B) MPCs ou metaloftalocianinas, onde M representa o centro metálico.



As MPCs são bastante estudadas devido às suas propriedades eletroquímicas, as quais podem ser alteradas pelo número e natureza dos substituintes no anel, estado de oxidação do metal, propriedades dos substituintes e natureza do solvente (BROWN E KUCERNAK, 2001; ÖMEROGLU E BIYIKLIOGLU, 2015). As PCs demonstram ser eletrocatalisadores eficientes para um grande número de reações de oxidação-redução, devido a diferentes estados de oxidação do centro metálico, dos processos redox que ocorrem no anel das PCs ou em ambos (ÖMEROGLU e BIYIKLIOGLU, 2015).

A oxidação que ocorre no anel das MPCs ou em seu centro metálico depende exclusivamente dos níveis de energia dos orbitais de fronteira, orbitais “d” para os metais de transição, e os orbitais do anel, particularmente os orbitais HOMO e LUMO. É possível observar dois processos redox no anel da PC pela remoção de elétrons do orbital HOMO e adição de elétrons no LUMO, respectivamente (BROWN e KUCERNAK, 2001; NAS *et al.*, 2017).

A diferença no comportamento voltamétrico das MPCs pode ser atribuída à participação do metal na reação, as que apresentam Co(II), Mn(II) e Fe(II) como centro metálico, por exemplo, os níveis de energia dos orbitais “*d*” encontram-se entre os orbitais moleculares HOMO e LUMO da PC, desta forma o centro metálico é redox ativo e, portanto, são reduzidos e/ou oxidados mais facilmente que os complexos de Zn(II), Ni(II) ou Cu(II) (GÖK *et al.*, 2016; KURT *et al.*, 2017; NAS *et al.*, 2017). Vários estudos eletroquímicos têm sido realizados utilizando as MPCs, dentre as mais utilizadas encontram-se as ftalocianinas de ferro (FePC), níquel (NiPC), cobre (CuPC), zinco (ZnPC) e cobalto (CoPC) (DEON *et al.*, 2015; DEVAENATHIPATHY *et al.*, 2015; BROWN e SCHOENFISCH, 2018; JERKOVIĆ *et al.*, 2018;).

A FePC foi o primeiro complexo de metaloftalocianina a ser descoberto em 1927 e tem se mostrado um excelente eletrocatalisador para várias reações químicas e eletroquímicas. A oxidação desse complexo ocorre de forma mais intensa em potenciais negativos na presença de Cl ou OH, os quais estabilizam o complexo Fe(III) (L’HER E PONDAVEN, 2003; ÖMEROGLU E BIYIKLIOGLU, 2015).

A NiPC é um material semicondutor e pode ser aplicada em estudos eletroquímicos para eletrocatalisar reações de diversas espécies químicas. As NiPC tetrassulfonadas (NiTsPC) apresentam maior facilidade de oxidação do centro metálico quando comparada a NiPC, fato que se deve à presença de grupos substituintes ligados covalentemente aos anéis das PCs, que atuam como retiradores de elétrons. No entanto, devido à alta solubilidade da NiTsPC em água, a modificação não pode ser feita incorporando-a diretamente na superfície ou na composição do eletrodo, necessitando que outros métodos mais elaborados sejam utilizados para modificação (DE LUCENA *et al.*, 2018). Segundo a literatura as propriedades redox dessa PC estão diretamente relacionadas com o centro metálico (O’DONOGHUE *et al.*, 2017).

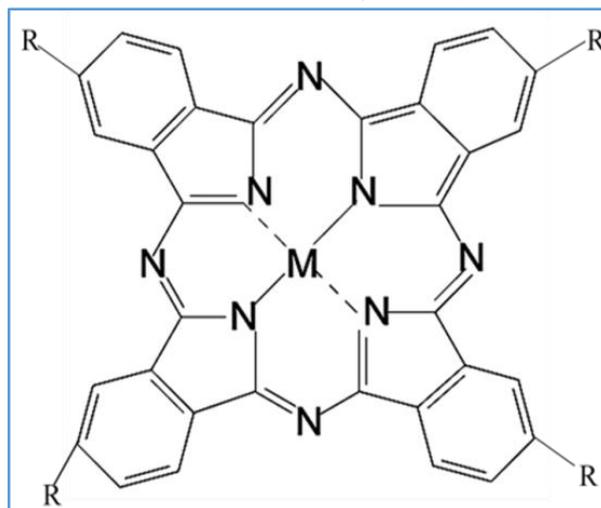
A CuPC foi descoberta há quase 80 anos, no entanto devido a sua baixa atividade eletrocatalítica comparada a outras ftalocianinas metálicas, poucos estudos eletroquímicos podem ser encontrados na literatura (BORSOS E INZELT, 2015). Estudos com CuPC demonstram que o centro metálico não participa da reação, neste caso, as reações de oxidação e/ou redução ocorrem apenas no anel da PC (ARICI *et al.*, 2013). A partir de dados voltamétricos, é possível observar que a oxidação e/ou redução dos anéis das PCs dependem fortemente dos substituintes ligados ao anel, solvente utilizado e do centro metálico. Encontra-se bem fundamentado na literatura que a CuPC apresenta processos redox

reversíveis em que os sinais observados, tanto na faixa anódica quanto na faixa catódica, foram atribuídos à eletroatividade dos anéis da PC (BORSOS E INZELT, 2015; CARO *et al.*, 2003; L'HER E PONDAVEN, 2003).

O Zn foi bastante estudado como metal central para MPCs em aplicações industriais e médicas. A ZnPC recebeu muita atenção devido à inatividade do seu centro metálico, onde os processos redox são baseados nos macrocíclicos que formam as PCs. A eletroquímica da ZnPC tem sido amplamente estudada sendo possível observar os processos de redução e oxidação, os quais são reversíveis e quase reversíveis, respectivamente (L'HER E PONDAVEN, 2003; ÖZÇEŞMECI *et al.*, 2013).

Os complexos de cobalto têm sido amplamente utilizados devido às suas propriedades electrocatalíticas, que estão totalmente relacionadas com a complexidade da química de coordenação do cobalto (L'HER E PONDAVEN, 2003). As CoPC sofrem processos redox rápidos com pequenos gastos de energias, podendo atuar como mediadores de elétrons em diversas reações. O comportamento electrocatalítico da CoPC está associado a processos redox relacionados ao centro metálico, os quais envolvem os pares, Co(II)/Co(III) e Co(II)/Co(I) e processos que ocorrem no anel da PC, que podem envolver os pares PC(-2)/PC(-1) e PC(-2)/PC(-3) (LOURENÇO *et al.*, 2016; ÖZGÜL *et al.*, 2015). O complexo de CoPC possui uma química bastante complexa, cuja mudança nos potenciais dos processos redox ocorre devido à adição de grupos substituintes ligados ao anel, os quais contribuem para o aumento de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, dessa forma a primeira reação de redução ocorre no centro metálico, sendo a redução do anel da PC muito mais difícil (L'HER E PONDAVEN, 2003).

As MPCs não substituídas apresentam baixa ou nenhuma solubilidade em água e em alguns solventes, mas essa solubilidade pode ser aumentada adicionando aos anéis de isoindol grupos doadores (-NH₂, Ar-S, RO- etc.) ou receptores (F, Cl, Br, NO₂ etc.) de elétrons ou grupos de cadeias volumosas (**Figura 4**). As substituições podem ser feitas de diferentes formas e contribuem para o aumento da solubilidade e o enriquecimento das propriedades electroquímicas, físicas e químicas desses complexos (ARICI *et al.*, 2013; KARUPPIAH *et al.*, 2015).

Figura 4 - Estrutura da ftalocianina substituída (R = NH₂, Ar-S, RO, SO₃, F, Cl, Br)

2.3.1 USO DE MPCs COMO MEDIADORES DE ELÉTRONS

A grande variedade de estados de oxidação das MPCs, associado as diversas alternativas de substituição e a facilidade de sofrer reações redox, com pequenos gastos de energia, contribui para o aumento significativo na intensidade de corrente elétrica, refletindo diretamente no aumento da sensibilidade do método proposto, possibilitando muitas vezes a determinação de substâncias que não apresentam eletroatividade em substratos não modificados. Desta forma, o uso das MPCs tem sido cada vez maior no desenvolvimento de diversos sensores eletroquímicos para determinar diferentes espécies em diversas matrizes (BROWN E KUCERNAK, 2001; NAS *et al.*, 2017).

Em 2013, Nascimento e colaboradores desenvolveram um CPE modificado com CoPC para determinação de ácido cítrico (CA) em amostras de sucos comerciais utilizando um pré-tratamento simples da amostra para eliminar a interferência causada por outros ácidos orgânicos presentes nas amostras analisadas. É importante destacar que a presença da CoPC tornou possível a determinação eletroquímica do CA, pois o mesmo não apresenta eletroatividade em eletrodos sólidos convencionais. O método proposto apresentou LOD de 2,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LOQ de 8,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a quantificação na amostra foi realizada após os estudos voltamétricos utilizando um método de análise em fluxo associada à técnica de amperometria (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Karuppiyah *et al.* (2015) utilizaram o GCE modificado com NiTsPc e FMWCNT para determinação de dopamina em amostras de sangue humano. Os autores basearam-se nas interações eletrostáticas entre o substrato modificado, uma vez que a modificação encontrava

- se carregada negativamente e a dopamina, carregada positivamente. Neste trabalho verificou-se o comportamento da dopamina frente ao GCE não modificado e modificado com NiTsPc, FMWCNT e FMWCNT-NiTsPc, este último apresentou melhores resultados, mostrando que o uso da NiTsPc juntamente com o FMWCNT contribuiu consideravelmente para obtenção de uma melhor resposta analítica, possibilitando a determinação desse composto na faixa de $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de interferentes como o ácido ascórbico e ácido úrico (KARUPPIAH *et al.*, 2015).

Abbas *et al.* (2015) desenvolveram um novo sensor de cisteína combinando o efeito catalítico das nanopartículas de ouro com a FePC. O objetivo do trabalho consistiu na modificação do CPE para a determinação de cisteína em formulações farmacêuticas, na presença de diferentes interferentes. Os resultados mostraram a diminuição da resistência do sensor à medida que aumentou a quantidade de FePC para 5%, estando este comportamento relacionado à atividade catalítica da PC. No entanto, houve uma melhoria significativa de transferência de elétrons com a inclusão de 0,055% das nanopartículas de ouro, o que resultou na significativa transferência de elétrons juntamente com o deslocamento do potencial de pico para potenciais menos positivos, de 0,75 V para 0,62 V (ABBAS *et al.*, 2015).

Um sensor amperométrico para determinação de hidrazina foi desenvolvido utilizando MWCNT e FeTsPc, os resultados mostraram melhores respostas voltamétricas e consequentemente menores LOD e LOQ e baixo potencial de oxidação da hidrazina quando comparado com outros eletrodos modificados. Esses estudos mostraram que há uma forte interação π - π entre os orbitais moleculares dos MWCNT moleculares da FeTsPc, fazendo com que esses compostos sejam excelentes eletrocatalisadores, contribuindo para a obtenção de uma maior corrente de pico e, consequentemente, maior sensibilidade do método proposto. O sensor desenvolvido apresentou alta sensibilidade com LOD de $7,6 \text{ nmol L}^{-1}$ (DEVASENATHIPATHY *et al.*, 2015).

Um CPE modificado com CuTsPc imobilizada na superfície do substrato por sílica organofuncionalizada contendo o grupo 1,4-diazabicyclo[2, 2, 2]octano foi utilizado para determinar dopamina utilizando a CV. Os estudos mostraram que a resposta eletroquímica da dopamina na presença da CuTsPc mostra potenciais de picos mais baixos e maiores intensidades de correntes quando comparados com o CPE ausente da modificação com a ftalocianina. Ao comparar o desempenho do eletrodo desenvolvido com outros encontrados na literatura para determinação de dopamina, observa-se que o CPE modificado com a

CuTsPc apresentou melhores resultados de LOD, com valor encontrado de $0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$ (DEON *et al.*, 2015).

Um GCE foi modificado com quitosana e CuTsPc para determinação de metronidazol em amostras farmacêuticas e de urina. A quitosana foi escolhida como agente dispersante devido sua forte interação eletrostática com a CuTsPc, estabilizando assim o filme formado sobre o substrato. Além disso, a baixa solubilidade da quitosana em água a faz atuar como camada protetora da PC que a mantém dispersa na matriz da quitosana. A presença do modificador alterou o aparecimento do processo de redução referente ao analito de $-0,44 \text{ V}$ no GCE para $-0,47 \text{ V}$ no sensor modificado e obteve-se valores de correntes 3 vezes maiores comparado as correntes obtidas em GCE. A curva analítica foi construída numa faixa de concentração de $6,0$ a 80 nmol L^{-1} utilizando a DPV, obtendo um limite de detecção de $0,41 \text{ nmol L}^{-1}$ (MEENAKSHI *et al.*, 2016).

Holanda e colaboradores (2016) desenvolveram uma metodologia para quantificação de acetaminofeno utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro, FMWCNT e CoPC por SWV. Segundo os autores, a interação dos FMWCNT com os complexos de MPCs ocorre através das interações π - π não covalentes, apresentando maiores efeitos catalíticos e melhorando a taxa de transferência de elétrons. Dessa maneira obtiveram um processo redox bem definido com maiores correntes de picos comparados com o sensor não modificado, apresentando valores de $0,135 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,450 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o LOD e LOQ, respectivamente (HOLANDA *et al.*, 2016).

Huayhuas-Chipana e colaboradores (2017) empregaram a NiTsPc para determinação de 2-nitro-p-fenilenodiamina em água de torneira utilizando um eletrodo de ouro impresso modificado a partir do método de monocamada automontada, construída a partir do 3-mercaptopropil-sulfonato e, posteriormente coberto com multicamadas de quitosana, dodecil sulfato de sódio e a NiTsPc. Para fins analíticos utilizou-se a SWV e um sistema de análise em fluxo, alcançando valores de LOD e LOQ, $1,2$ e $4,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, inferiores aos métodos encontrados na literatura (HUAYHUAS-CHIPANA *et al.*, 2017).

Recentemente, Jerković e colaboradores (2018) desenvolveram um CPE modificado com CoPC e MWCNT para determinação de ácidos graxos poli-insaturados, em particular o ácido linoleico presente em amostras de óleo de cártamo com pré-tratamento simples da amostra, apresentando LOD e LOQ de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (JERKOVIĆ *et al.*, 2018).

As pesquisas apresentadas até aqui destacam que o extenso uso das MPCs, substituídas e não substituídas, evidencia sua grande importância em investigações eletroquímicas como eletrocatalisadores para uma grande variedade de moléculas, possibilitando estudos com espécies que não apresentam eletroatividade em eletrodos sólidos convencionais, viabilizando a determinação de diferentes compostos em diversas matrizes através do desenvolvimento de métodos voltamétricos.

2.4 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

A eletroanalítica ou eletroanálise se desenvolveu a partir da descoberta da polarografia (primeira técnica voltamétrica) pelo químico Jaroslav Heyrovsky em 1922. Na polarografia, um eletrodo gotejante de mercúrio é utilizado como eletrodo de trabalho para monitorar e identificar reações de diferentes compostos, tais como metais, compostos orgânicos e organometálicos (ZANONI *et al.*, 2017). De forma geral, essas técnicas fundamentam-se nos fenômenos que ocorrem na interface do eletrodo de trabalho e a solução adjacente a sua superfície (SOUZA *et al.*, 2003).

A voltametria baseia-se na medida da corrente elétrica em uma célula eletroquímica resultante de uma reação de oxirredução durante a aplicação controlada de um potencial, favorecendo a transferência de elétrons. A corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo, com o potencial controlado frente a um eletrodo de referência, em geral Ag/AgCl, e a cinética da reação redox é controlada pela velocidade da transferência de elétrons e de massa do analito para a superfície do eletrodo (BARD *et al.*, 2008; BRETT E BRETT, 1993). As principais técnicas voltamétricas são a Voltametria Cíclica (CV), Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) e Voltametria de Onda Quadrada (SWV) (BARD *et al.*, 2001; BRETT E BRETT, 1993; WANG, 2000).

O funcionamento da CV consiste basicamente na aplicação de um potencial na forma de uma onda triangular no eletrodo de trabalho com velocidade conhecida. Ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial e essa aplicação de potencial resulta na oxidação e/ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho (HELMUT E WILLIAMS, 2001; OZKAN *et al.*, 2015; WANG, 2000). Esta técnica possibilita investigar o comportamento redox de espécies eletroativas e permite a identificação de intermediários ou produtos de reação. Além disso, é utilizada para fornecer informações quantitativas sobre a cinética de reação de transferência de elétrons bem como o conhecimento acerca da reversibilidade do sistema (BARD *et al.*, 2008). Nos processos

reversíveis a velocidade de transferência de elétrons em ambas as direções é extremamente rápida e o sistema atinge o equilíbrio durante todos os processos redox. Nos processos irreversíveis não se observa resposta voltamétrica na varredura correspondente ao sentido oposto e a etapa de transferência de carga é lenta. Os processos quase-reversíveis são processos não reversíveis, que dependendo da velocidade de varredura tornam-se irreversíveis, como nesse tipo de reação a cinética é lenta, as espécies eletroativas chegam à superfície do eletrodo com um certo atraso, nestes processos há um deslocamento do potencial de meia onda (BARD *et al.*, 2001, 2008; BRETT E BRETT, 1993; TICIANELLI E GONZÁLEZ, 2005; WANG, 2000).

Com o surgimento da era digital, as técnicas de pulso começaram a substituir as polarográficas na década de 50 e têm sido amplamente utilizada até os dias atuais (SOUZA *et al.*, 2003). A DPV foi proposta por Barker e Gardner no ano de 1953, com a finalidade de diminuir os limites de detecção e quantificação de compostos eletroquimicamente ativos. Nesta técnica a corrente capacitiva é proporcional a $e^{-t/RC}$, onde t é o tempo, R é a resistência da solução e C é a capacitância da dupla camada elétrica, sendo a corrente faradaica proporcional a $t^{-1/2}$, por isso o decaimento da corrente capacitiva após a aplicação do pulso é muito mais rápida, do que o da faradaica. Assim essas correntes são subtraídas e, então, registradas *versus* o potencial aplicado (BARD *et al.*, 2008; BRETT & BRETT, 1993). Esta é uma das técnicas de pulso mais sensível e extremamente útil para quantificar compostos orgânicos e inorgânicos em níveis de traços (HARRIS, 2001). Na DPV, pulsos de potencial sucessivos são aplicados sobre uma rampa ou escada de potencial com incremento em intervalos periódicos de tempo e iguais amplitudes, onde a corrente medida é lida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e outra no final da vida do pulso (BARD *et al.*, 1944, 2008).

A SWV começou a ser estudada por Geoffrey Barker e colaboradores em 1953 com o objetivo de compensar a corrente capacitiva residual obtida nas análises polarográficas, aquela é considerada uma das técnicas de pulso mais rápida e sensível (BARD *et al.*, 2008; SKOOG *et al.*, 2005). O potencial utilizado corresponde à aplicação de uma onda quadrada de amplitude constante sobreposta a uma escada de potencial (igual período), entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, enquanto o sinal de resposta corresponde na medida da corrente elétrica, a qual é amostrada no final de cada pulso direto e reverso onde são obtidos simultaneamente os dois sinais de resposta, um referente à corrente direta, relativo ao pulso direto, e outro à corrente reversa, relativo ao pulso reverso. Portanto, a corrente total corresponde à diferença entre a corrente direta e a reversa (BARD *et al.*, 2008;

BRETT E BRETT, 1993; SKOOG *et al.*, 2005; WANG, 2006). Esta técnica permite a eliminação quase total da corrente capacitiva, haja vista que as correntes são amostradas em iguais intervalos de tempo, o que leva a uma medida essencialmente faradaica, ou seja, obtenção de medidas de correntes elétricas diretamente proporcionais à concentração do analito. Tal comportamento faz da SWV uma técnica extremamente sensível podendo ser comprada as técnicas cromatográficas (SKOOG *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2003; TICIANELLI E GONZÁLEZ, 2005).

Uma etapa importante associada à versatilidade das técnicas voltamétricas é a escolha do material do eletrodo de trabalho, que deve apresentar elevada sensibilidade e seletividade em aplicações eletroquímicas e eletroanalíticas (USLU E OZKAN, 2007). Alguns problemas associados à presença de interferentes nas matrizes podem ser encontrados e uma das alternativas é a utilização do método de preparo de amostra, no entanto, a alta complexidade desses procedimentos torna inviável o desenvolvimento dos métodos voltamétricos para aplicação em matrizes complexas. Outra alternativa é a utilização de ferramentas quimiométricas capazes de contornar o alto grau de sobreposição causado por outras espécies presentes na amostra, possibilitando a quantificação do analito com precisão e confiabilidade (JALALVAND *et al.*, 2019).

2.5 TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS

As técnicas quimiométricas utilizam modelos matemáticos e estatísticos para fornecer o máximo de informações analíticas através da análise dos dados instrumentais, possibilitando a interpretação de dados cada vez mais complexos (AHMADVAND *et al.*, 2017; ARANCIBIA *et al.*, 2012; ESCANDAR *et al.*, 2014). A quimiometria é uma subárea da química analítica e um dos principais objetivos que impulsionou os químicos analíticos a desenvolverem os métodos quimiométricos foi a complexidade apresentada pelos dados instrumentais (MILLER, 2010).

O planejamento e otimização de experimentos, o reconhecimento de padrão e a calibração fazem parte das técnicas quimiométricas que são utilizadas para planejar e/ou obter informações acerca de dados analíticos. O planejamento e otimização de experimentos é empregado para diminuir o número de ensaios e otimizar as condições experimentais de determinados experimentos de bancada (TORBJORN *et al.*, 1998). O reconhecimento de padrão busca semelhanças no sistema químico analisado através de análises exploratórias nos dados (BRERETON, 2015) e a calibração constrói modelos matemáticos capazes de

correlacionar propriedades química do(s) analito(s) com diversos sinais registrados no instrumento (BRERETON, 2000).

Na calibração univariada, apenas uma grandeza instrumental é obtida, a qual é relacionada com uma propriedade do analito, que geralmente é a concentração (KOŚCIELNIAK E WIECZOREK, 2016). Mesmo que bastante difundida e consolidada na literatura, algumas dificuldades podem ser encontradas, como a presença de espécies interferentes, o que dificulta ou até mesmo impossibilita a análise (ARANCIBIA *et al.*, 2012; ESCANDAR *et al.*, 2007, 2014; OLIVIERI, 2014).

A calibração multivariada utiliza um conjunto de sinais instrumentais que podem ser relacionados com a concentração de um ou mais analitos, possibilitando a detecção simultânea de espécies químicas presentes na amostra analisada. No entanto, para evitar a presença de interferentes, faz-se necessário modelar o máximo de espécies químicas na etapa de calibração e, para isso, o modelo de calibração deve ser construído utilizando o máximo de amostras, pois quanto mais espécies for modeladas na calibração, menor a possibilidade de interferentes no momento da predição (BRO, 2003; MASSART, 1997).

A complexidade da maioria das matrizes levou aos avanços instrumentais na química analítica, como a obtenção de sinais para uma mesma amostra em mais de um sensor, dando origem aos dados de segunda, terceira e quarta ordem, em que cada sinal é função de, pelo menos, três fontes diferentes de variação, como por exemplo, nos dados voltamétricos podemos ter a variação da corrente, do potencial de varredura e da frequência de pulso ou pH (ESCANDAR *et al.*, 2007; AMIGO E MARINI, 2013). Tais avanços influenciaram no desenvolvimento de métodos quimiométricos mais complexos que fossem capazes de extrair informação de dados multivias, surgindo assim a calibração multivias (ARANCIBIA *et al.*, 2012; ESCANDAR *et al.*, 2014).

A calibração multivias foi desenvolvida com o objetivo de minimizar a necessidade de analisar inúmeras amostras, como se faz na calibração multivariada (OLIVIERI, 2014). Além disso, a calibração multivias apresenta a “vantagem de segunda ordem” que possibilita quantificar com precisão um ou mais analitos na presença de diversos interferentes que não foram incluídos na etapa de calibração (OLIVIERI, 2012). Esta característica, além de contribuir para o aumento significativo da seletividade do método proposto, reduz o número de amostras a serem modeladas (OLIVIERI, 2012).

Para se fazer uso dos métodos quimiométricos é necessário saber o tipo de dados que será gerado pela instrumentação analítica utilizada (AHMADVAND *et al.*, 2017;

ESCANDAR *et al.*, 2014). Em outras palavras, significa dizer que a característica de cada conjunto de dados, aliado aos diversos sensores usados para descrever uma única propriedade química do(s) analito(s), deve ser observado criteriosamente antes de selecionar o método de calibração multivias a ser utilizado, levando em consideração as ferramentas singulares que cada algoritmo possui para contornar os problemas existentes nos dados a serem analisados (SMILDE *et al.*, 2004; BRO *et al.*, 2008; AMIGO E MARINI, 2013).

Entre os métodos quimiométricos mais utilizados no tratamento dos dados voltamétricos de segunda ordem, podemos citar os mínimos quadrados parciais desdobrado com bilinearização residual (U-PLS/RBL) (DIEZ *et al.*, 2015; JALALVAND *et al.*, 2015; JALALVAND *et al.*, 2015). O sucesso do uso deste algoritmo, neste tipo de dados, está associado a flexibilidade do U-PLS/RBL frente a capacidade de alcançar a vantagem de segunda ordem e a quebra da trilinearidade dos dados (em um dos modos o perfil instrumental do analito varia a cada medida e conseqüentemente a diferença de uma amostra para outra deixa de ser apenas em intensidade, por exemplo, dos dados voltamétricos há um deslocamento natural dos potenciais de pico a cada medida para um mesmo analito fazendo com que a trilinearidade dos dados voltamétricos seja rompida) (AHMADVAND *et al.*, 2017; ARANCIBIA *et al.*, 2012; ESCANDAR *et al.*, 2014).

2.5.1 MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS DESDOBRADOS COM BILINEARIZAÇÃO RESIDUAL (U-PLS/RBL)

O U-PLS é uma extensão dos mínimos quadrados parciais (PLS) clássico aplicado a dados multivias desdobrados (ESCANDAR *et al.*, 2007; OLIVIERI *et al.*, 2015). No entanto, esse modelo não alcança a “vantagem de segunda ordem” quando constituintes não modelados na etapa de calibração encontram-se presentes na amostra.

O primeiro passo da modelagem U-PLS é converter cada uma das matrizes de calibração ($J \times K$) em vetores ($JK \times 1$). Após esse desdobramento, uma nova matriz de calibração X_c é construída colocando todos os vetores da coluna adjacente um ao lado do outro. Em seguida, a matriz X_c é submetida à regressão PLS clássica, sendo decomposta pelo produto de duas matrizes, P (matriz de pesos) e T (matriz de escores). O número ideal de variáveis latentes é obtido pela validação cruzada, necessária para explicar a variação em X_c minimizando a matriz residual (E_c) de acordo com a **Equação (1)** abaixo:

$$X_c = PT^T + E_c \quad (1)$$

Posteriormente, o modelo é utilizado para prever a concentração da amostra desconhecida (y) na matriz de predição (X_{pred}) usando os escores da amostra desconhecida (T) e o vetor de coeficientes de regressão (v) de acordo com a **Equação (2)**:

$$y = V^T T \quad (2)$$

Quando constituintes não calibrados estão presentes em X_{pred} , os escores T da amostra desconhecidas são inadequadas para a predição da concentração do analito. Este problema pode ser resolvido utilizando a etapa de bilinearização residual (RBL). A RBL mantém constante a matriz P , obtida na etapa de calibração, variando T e minimizando a matriz E_c , pelo procedimento iterativo ou Gauss-Newton (ALFARHANI *et al.*, 2018; ESCANDAR *et al.*, 2007; OLIVIERI *et al.*, 2015) de acordo com a **Equação (3)** abaixo:

$$\text{Vec}(X_C) = PT + \text{Vec} [B_{\text{une}} G_{\text{une}}(C_{\text{une}})^T] + E_C \quad (3)$$

Onde, $[B_{\text{une}} G_{\text{une}}(C_{\text{une}})^T]$ é uma matriz truncada para N fatores (N corresponde idealmente ao número de interferentes presentes na amostra), obtida pela decomposição do valor singular (SVD) da matriz E_c , de acordo com a **Equação (4)** abaixo:

$$B_{\text{une}} G_{\text{une}}(C_{\text{une}})^T = \text{SVD}(E_C) \quad (4)$$

Se o resíduo obtido para N fatores RBL não estiver em concordância com o resíduo instrumental estimado para o conjunto de calibração, o procedimento RBL deve ser conduzido para $N + 1$ fator.

O método analítico desenvolvido é avaliado por parâmetros de desempenho analítico, que corresponde a valores numéricos calculados em função da sensibilidade e do ruído instrumental e, para este fim, Olivieri e colaboradores propuseram uma forma de calcular a sensibilidade baseada na propagação da incerteza na calibração (OLIVIERI *et al.*, 2015). Os parâmetros mais utilizados para a avaliação do método são, sensibilidade, sensibilidade analítica, LOD, LOQ e o erro relativo de predição. A sensibilidade é calculada com a **Equação (5)**:

$$SEN = \{g_n^T [Z_{\text{exp}}^T (I - Z_{\text{unx}} Z_{\text{unx}}^+) Z_{\text{exp}}]^{-1} g_n\}^{-1/2} \quad (5)$$

Onde, Z_{exp} representa o comportamento dos constituintes calibrados (corresponde aos loadings de calibração), o vetor g_n seleciona adequadamente os loadings refletindo especificamente o comportamento do analito. O fator $(I - Z_{\text{unx}} Z_{\text{unx}}^+)$ é a forma matemática

da vantagem de segunda ordem, sendo Z_{unx} , uma matriz de blocos construída a partir dos perfis extraídos dos componentes não-calibrados.

A sensibilidade analítica é a razão entre a sensibilidade e ruído instrumental, como mostra a **Equação (6)**:

$$\gamma = \text{SEN}/\sigma_x \quad (6)$$

Essa grandeza é medida em unidade de concentração e independente do sinal medido, podendo ser empregado para comparar diferentes metodologias. A sensibilidade analítica é tida como o inverso da diferença de concentração mínima que pode ser observada ao longo do intervalo analítico linear, onde $\gamma = \sigma_y^{-1}$. Em que σ_x corresponde as variâncias nos sinais instrumentais e σ_y as variâncias nas concentrações de calibração (OLIVIERI *et al.*, 2015).

Outros dois parâmetros de desempenho analítico importantes são, LOD e LOQ, em que o LOD corresponde a menor concentração do analito presente em uma amostra, que pode detectada de forma confiável (em geral 95% de confiança) e seu valor pode ser obtido através da **Equação (7)**.

$$LOD = \frac{3S_b}{b} \quad (7)$$

Já o LOQ é a menor concentração do analito que o método é capaz de quantificar e seu valor é obtido através da **Equação (8)**.

$$LOQ = \frac{10S_b}{b} \quad (8)$$

Onde S_b é o desvio-padrão da média do sinal do branco em eletrólito e b é a sensibilidade da curva analítica e as constantes 3,3 e 10, correspondem a probabilidade de erros à 95% de confiança das curvas gaussianas.



Capítulo 3
Determinação de ácido
tartárico em vinhos

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o comportamento eletroquímico do TA sobre eletrodos de pasta de carbono modificados com diferentes ftalocianinas metálicas;
- Quantificar o TA na presença de interferentes utilizando ferramentas quimiométricas para eliminar o efeito de interferência nas amostras de vinho;
- Construir modelos de calibração para o TA empregando soluções padrão, seguido da modelagem dos dados com os Mínimos quadrados parciais desdobrados com bilinearização residual (U-PLS/RBL);
- Testar o modelo de calibração através do conjunto de validação constituído pela mistura dos ácidos láctico, málico, tartárico e succínico para explorar a vantagem de segunda ordem;
- Aplicar o modelo validado na predição do TA nas amostras de vinhos.

4 EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os produtos químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água deionizada de um sistema Millipore Milli-Q (condutividade de $0,1 \leq \mu\text{S cm}^{-1}$). Todas as MPCs (97%), óleo mineral e pó de grafite ($\leq 20 \mu\text{m}$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e a acetona (99,5%) obtida da Quemis, enquanto que os ácidos, tartárico, láctico, málico e succínico foram adquiridos da VETEC. O tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (ajustado a pH = 3,0, 4,5 e 6,2), foi usado como eletrólitos de suporte. Soluções estoque de TA, ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) para os estudos eletroquímicos foram preparadas diariamente no eletrólito suporte. As soluções estoques dos ácidos utilizadas no planejamento foram preparadas na concentração de $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ no eletrólito suporte (pH 4,5), com diluições subseqüentes na célula eletroquímica.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO E PROGRAMA DE CONTROLE

Todas as medidas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Eco Chemie Autolab (Modelo PGSTAT 302N) (**Figura 5**) controlado pelo programa NOVA 1.10.4. Os estudos de CV e de SWV foram realizados utilizando uma célula eletroquímica de compartimento único de 40 mL composta por um CPE modificado ou não modificado como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl, $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodo de referência e um bastão carbono vítreo como eletrodo auxiliar.

Figura 5 - Imagem do potenciostato/galvanostato Eco Chemie/Autolab (Modelo PGSTAT302N)



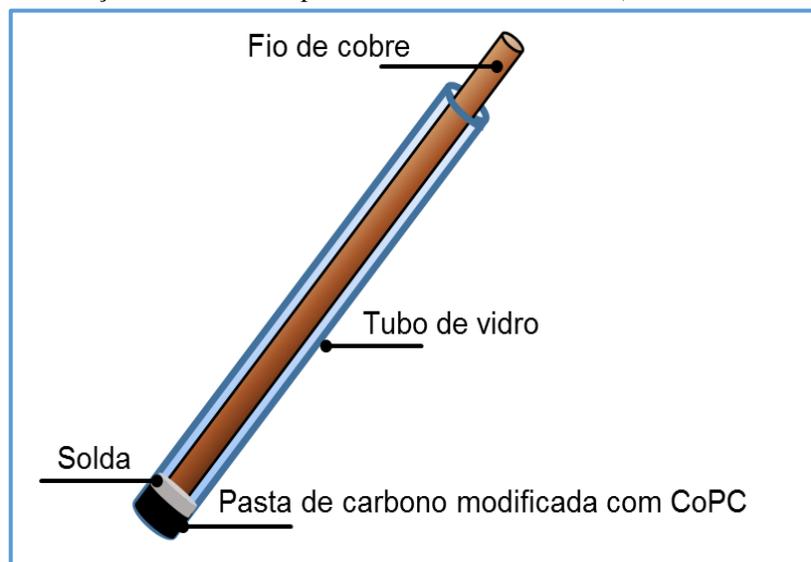
Todos os tratamentos quimiométricos foram realizados em ambiente MATLAB 2010. Para a correção da linha de base dos dados, utilizou-se a rotina de regressão spline dos mínimos quadrados assimétricos (AsLSSR) (EILERS *et al.*, 2006). Para corrigir o deslocamento do sinal voltamétrico, causado por alguns fenômenos que ocorrem na interface eletrodo/solução, foi utilizado o alinhamento por correção otimizada (COW) (NIELSEN *et*

al., 1998). Esse método é baseado em uma função de correção linear, que consiste na sincronização de sinais inteiros e é composto de segmentos cuja inclinação é permitida para obter um número limitado de valores. Os intervalos correspondentes na amostra contêm um número diferente de pontos e a interpolação linear é usada para que eles sejam compactados ou expandidos para o mesmo comprimento, com intervalos correspondentes ao sinal de referência (JALALVAND *et al.*, 2019). Por fim, utilizou-se a caixa de ferramentas MVC2 (OLIVIERI *et al.*, 2009) para construir os modelos U-PLS/RBL (ÖHMAN *et al.*, 1990; WOLD *et al.*, 1987).

4.3 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO

Com base na literatura (LOURENÇO, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2013), o preparo do eletrodo de trabalho seguiu o seguinte procedimento: a pasta de carbono modificada com a CoPC foi preparada através da mistura direta em almofariz durante 10 minutos utilizando 57% de pó de carbono e 3% de CoPC. Em seguida a mistura foi dispersa em acetona sob agitação até a completa evaporação do solvente e por fim adicionou-se 40% de óleo mineral. A construção do sensor (CoPC-CPE) foi realizada a partir da inserção da mistura pasta de carbono/CoPC em um tubo de vidro com diâmetro interno de aproximadamente 3 mm contendo fio de cobre como contato elétrico no lado oposto, como ilustrado na **Figura 6**.

Figura 6 - Ilustração do eletrodo de pasta de carbono modificado (Fonte: LOURENÇO, 2016)



4.4 PROCEDIMENTO ELETROQUÍMICO

Foi adotado o procedimento desenvolvido por Lourenço (2016) para a obtenção dos dados voltamétricos (LOURENÇO, 2016). Em que o CoPC-CPE foi mecanicamente polido com um papel manteiga e posteriormente foi realizado um pré-tratamento eletroquímico que consistiu em 10 varreduras sucessivas utilizando a SWV numa janela de potencial de 0,8 a 1,25 V em eletrólito suporte, garantindo assim um desempenho eletroquímico satisfatório do sensor. As medições voltamétricas foram todas realizadas utilizando-se as técnicas de CV e SWV em tampão acetato, pH = 4,5 como eletrólito suporte.

Para a obtenção dos dados voltamétricos as adições das soluções padrão e das amostras de vinho utilizaram 20s de agitação na célula eletroquímica em circuito aberto e tempo de equilíbrio de 5s, amplitude de pulso de 20 mV, incremento potencial de 5 mV, janela potencial de 0,8 a 1,25 V e frequência 20 Hz. Para obtenção dos dados de segunda ordem, a frequência foi variada numa faixa de 5 a 110 Hz, com incremento de 15 Hz, gerando uma matriz 8x90 (frequência x potencial) para cada solução padrão ou amostra e todas as medidas foram feitas em triplicatas.

4.5 CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO

Para o conjunto de calibração foram utilizadas 10 soluções padrão contendo apenas TA com concentrações variando de 10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Como os ácidos MA, LA e SA são eletroativos no CoPC-CPE e estão presentes no vinho juntamente com o TA (KRITSUNANKUL *et al.*, 2009), podem atuar como interferentes sobrepondo o sinal voltamétrico do analito, por isso tais ácidos foram utilizados para construir o conjunto de validação. As concentrações utilizadas estão mostradas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Valores de concentração das misturas do conjunto de validação preparado com base no planejamento Taguchi (KACKER *et al.*, 1991)

Misturas	$(\mu\text{mol L}^{-1})$			
	TA	SA	LA	MA
1	25	25	25	25
2	25	45	45	45
3	25	65	65	65
4	25	85	85	85
5	45	25	45	65
6	45	45	25	85
7	45	65	85	25
8	45	85	65	45
9	65	25	65	85
10	65	45	85	65
11	65	65	25	45
12	65	85	45	25
13	85	25	85	45
14	85	45	65	25
15	85	65	45	85
16	85	85	25	65

Os valores de concentração destas misturas foram obtidos usando um planejamento Taguchi (KACKER *et al.*, 1991) com quatro níveis (concentrações) e quatro fatores (ácidos). As soluções padrão utilizadas no conjunto de calibração e validação foram preparadas em tampão de acetato (pH 4,5) diluindo-as diretamente na célula eletroquímica.

O planejamento Taguchi foi escolhido por garantir a ortogonalidade entre as misturas com um menor número de experimento (KACKER *et al.*, 1991; MAGHSOODLOO E ENGINEERING, 2004; GAITONDE *et al.*, 2006; CAVAZZUTI, 2013).

4.6 AMOSTRAS DE VINHOS E ESTUDO DE RECUPERAÇÃO

Dez amostras de vinhos, cinco tintos e cinco brancos, mostradas na **Tabela 2**, de diferentes tipos de uvas e origens, foram adquiridas no comércio local da cidade de João Pessoa-PB.

Tabela 2 – Identificação e descrição dos vinhos branco e tintos

Vinhos	Tipo de uva	Safra	Origem
Branços	Chenin Blanc	2011	Brasil
	Moscato Canelli	2015	Brasil
	Sauvignon Blanc	2012	Brasil
	Moscato	2016	Brasil
	Chardonnay	2014	França
Tintos	Mesa	2016	Brasil
	Mesa	2015	França
	Cabernet Sauvignon	2015	Chile
	Mesa	2014	Portugal
	Malbec	2016	Argentina

Para a obtenção das medidas voltamétricas, as diluições das amostras foram realizadas diretamente na célula eletroquímica contendo 20 mL do eletrólito suporte. Os parâmetros voltamétricos e o pré-processamento dos dados, correção de linha de base e alinhamento, empregado nas amostras de vinhos foram realizados da mesma forma das soluções padrão. O método dispensou qualquer tratamento prévio das amostras e para o estudo de recuperação foi empregado o método de adição de padrão, adicionando três níveis de concentração de TA (20, 50 e 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte e a amostra.

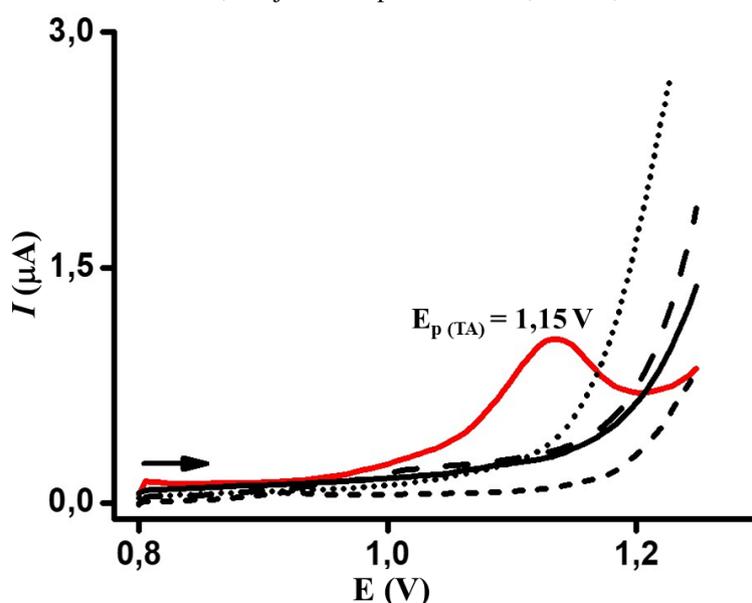
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPORTAMENTO REDOX DO TA EM MPCs – CPE E CPE

O comportamento eletroquímico do TA em CPE modificados com diferentes PCs, H₂PC, CoPC, CuPC, ZnPC e NiPC, foi investigado por SWV, numa janela de potencial de 0,8 V à 1,25 V em solução tampão acetato pH 4,5. Tendo em vista que as PCs apresentam sinais de oxidação na janela de trabalho utilizada, antes da adição do TA os eletrodos modificados foram submetidos a um tratamento eletroquímico de dez varreduras sucessivas para eliminação dos sinais e obtenção de uma melhor linha de base.

Como pode ser visto na **Figura 7**, foi possível observar que apenas com o uso da CoPC ocorreu a eletrocatalise do TA nas condições estabelecidas. Tal comportamento está associado a presença do centro metálico, pois quando fez o uso da H₂PC não mostrou qualquer sinal voltamétrico, mostrando que o uso da PC nesta forma não é suficiente para promover a eletrocatalise.

Figura 7 - Comportamento eletroquímico do TA em diferentes PCs – CPE. H₂PC (—); CoPC (—); CuPC (.....); ZnPC (— — —) e NiPC (— — — —) na presença de 60 μmol L⁻¹ de TA em tampão acetato (pH 4,5); $f = 20$ Hz, $\Delta E_p = 20$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV, em janela de potencial de 0,8 V à 1,25 V



A partir dos dados obtidos observou-se que a reação redox do TA depende da presença do cobalto na estrutura da MPC, uma vez que o uso de outras MPCs, tais como CuPC, ZnPC e NiPC, não mostrou sinal voltamétrico relacionado à oxidação do TA, o que corrobora com os dados da literatura (GÖK *et al.*, 2016; KURT *et al.*, 2017; NAS *et al.*, 2017). Os estudos

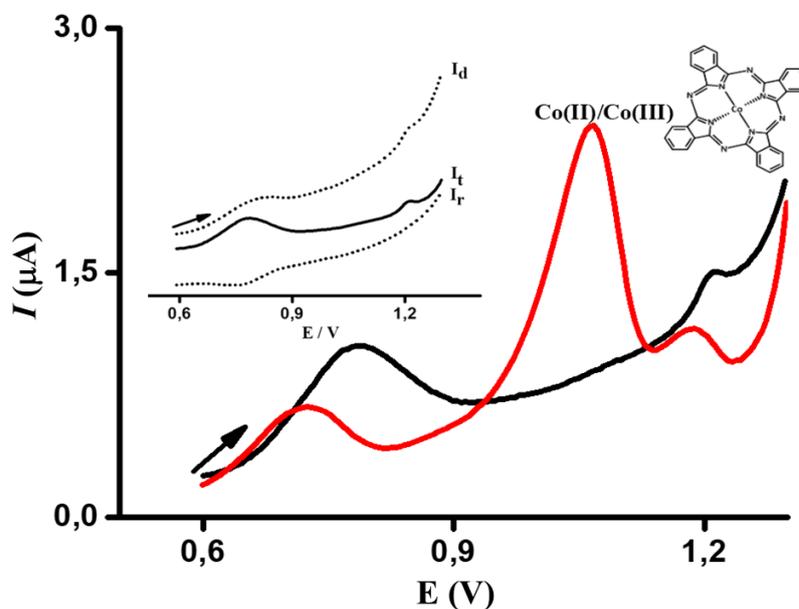
encontrados na literatura atribuem a diferença no comportamento redox das PCs com a presença do Co(II) no complexo, uma vez que o esse metal necessita de uma pequena quantidade de energia para que haja promoção de elétrons entre os orbitais HOMO e LUMO da PC, visto que as energias dos orbitais “*d*” do centro metálico encontram-se entre os orbitais moleculares da PC (GÖK *et al.*, 2016; KURT *et al.*, 2017).

A percentagem de MPC utilizada para modificar cada eletrodo foi de 3%, visto que a influência do modificador para o CoPC-CPE na determinação de TA já foi verificada em estudos anteriores (LOURENÇO, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2013). Assim como o efeito de memória e estudos utilizando CPE, para este, foi possível observar que o TA não apresenta resposta voltamétrica, uma vez que o TA não é eletroativo em eletrodos sólidos convencionais (LOURENÇO, 2016).

5.2 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO CoPC – CPE E DO H₂PC – CPE

Experimentos utilizando a H₂PC e a CoPC (Figura 8) foram realizados com o objetivo de investigar o mecanismo eletrocatalítico envolvido na oxidação do TA e, portanto, atribuir a eletrocatalise apenas ao centro metálico ou à processos que ocorrem no anel isoindol juntamente com o Co(II).

Figura 8 - Comportamento eletroquímico do CoPC – CPE e H₂PC – CPE em SWV, tampão acetato, pH = 4,5. Voltamogramas correspondentes a H₂PC (—) com inserção das componentes, *I_t* - corrente total, *I_d* - corrente direta e *I_r* - corrente reversa e CoPC (—); *f* = 20 Hz, $\Delta E_p = 20$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV, em janela de potencial de 0,8 V a 1,25 V

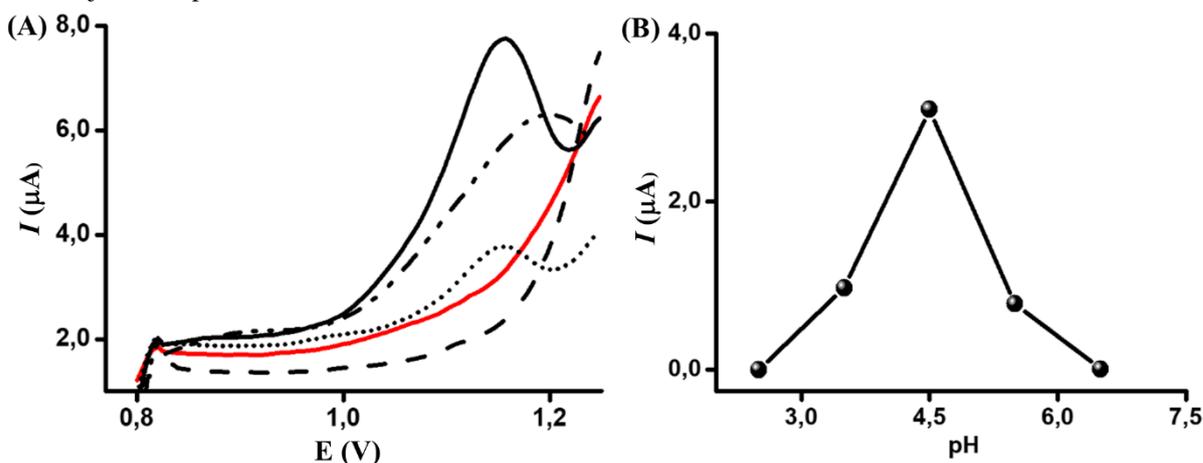


Os estudos foram realizados nas mesmas condições utilizadas para o CoPC-CPE, onde foi observado que os dois processos observados em 0,75 V e próximo a 1,2 V correspondem a processos redox que ocorrem no anel da PC. Além disso, como pode ser visto na **Figura 8**, há contribuição de um processo de redução em 0,75 V. Diante dos comportamentos eletroquímicos das duas PCs, H₂PC e CoPC, é possível afirmar que a onda catalítica bem definida em 1,15 V corresponde ao processo redox do Co(II)/Co(III). Portanto, a atividade electrocatalítica do CoPC-CPE para oxidação do TA claramente corresponde ao processo redox que ocorre no centro metálico da CoPC. Como pode ser observado na **Figura 8**, somente é possível obter a onda electrocatalítica referente à oxidação do TA frente ao CoPC-PCE, indicando que o processo envolve a oxidação electroquímica do Co(II).

5.3 INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DO TA

A DPV foi utilizada para avaliar a influência do pH sobre a corrente e potencial de pico para o TA (**Figura 9**). A faixa de pH estudada foi de 2,5 a 6,2, onde foi observado que há deslocamento do potencial de pico para potenciais mais positivos à medida que o valor de pH diminui. Tal comportamento pode estar associado à protonação dos íons tartarato, tendo em vista os valores de pka (2,9 e 4,2) do TA ([PERRIN *et al.*, 1981](#)). Paralelamente, observou-se que não há sinal redox em pH abaixo de 3,5 e acima de 5,5, obtendo um aumento significativo na corrente de pico com valores máximos de corrente em pH 4,5, sendo este escolhido para realização dos estudos subsequentes.

Figura 9 - Influência do pH na resposta electrocatalítica do TA (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão acetato sobre CoPC-CPE em DPV. (A) Voltamogramas correspondente: pH = 2,5 (—); 3,5 (— · —); 4,5 (—); 5,5 (.....) e 6,6 (— — —); (B) Gráfico da influência do pH sobre a corrente de pico; $f = 20$ Hz, $\Delta E_p = 20$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV, em janela de potencial de 0,8 V à 1,25 V

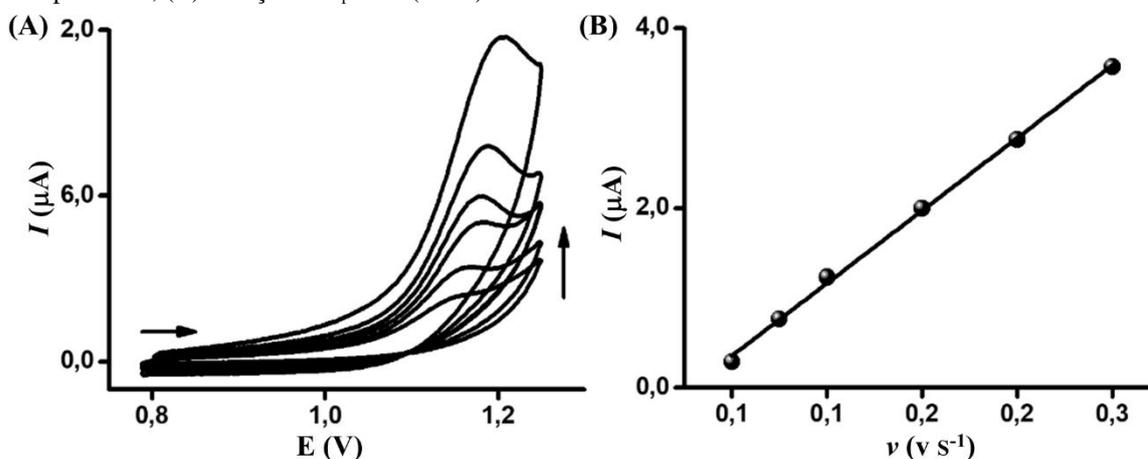


A partir da expressão $W_{1/2} = 90/n$, onde $W_{1/2}$ corresponde ao valor da largura do pico à meia altura e n corresponde ao número de elétrons, é possível sugerir o número de elétrons envolvido na reação. Para a oxidação eletrocatalítica do TA, o valor de $W_{1/2}$ obtido foi de aproximadamente 83,3 mV, indicando que a reação é governada pela transferência de apenas um elétron. Segundo a literatura, valores de $W_{1/2}$ próximo a 45 mV correspondem a reações eletroquímicas governadas pela transferência de dois elétrons e para valores próximos a 90 mV reações envolvendo apenas um elétron (BRETT E BRETT, 1993).

5.4 ESTUDO DE VELOCIDADE

Com o intuito de compreender a natureza do transporte de massa para a superfície do CPE-CoPC e o grau de reversibilidade da reação redox do TA, estudos utilizando a CV foram realizados para diferentes velocidades de varredura (50, 75, 100, 150, 200 e 250 mV) em tampão acetato, pH = 4,5. A partir dos voltamogramas registrados para este estudo, foi observado que o potencial de pico depende da velocidade de varredura (Figura 10A), ocorrendo um pequeno deslocamento para potenciais mais positivos à medida que aumenta a velocidade, indicativo de processos irreversíveis, tal comportamento foi evidenciado também pela ausência de processo redox na varredura reversa, dessa forma é possível afirmar que a oxidação eletrocatalítica do TA trata-se de um processo irreversível (GOWDA E NANDIBEWOOR, 2014).

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos de uma solução $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TA em tampão acetato (pH 4,5) sobre CV em diferentes velocidades de varredura (50, 75, 100, 150, 200 e 250 mV). (A) Voltamogramas correspondente, (B) Relação de I_p vs. v (V S^{-1})



A relação linear descrita pela equação $I_p (\mu\text{A}) = 2 \times 10^{-5} v (\text{V S}^{-1}) - 5 \times 10^{-7}$ ($R^2 = 0,999$) foi observada para o gráfico plotado para a corrente de pico (I_p) em função da velocidade

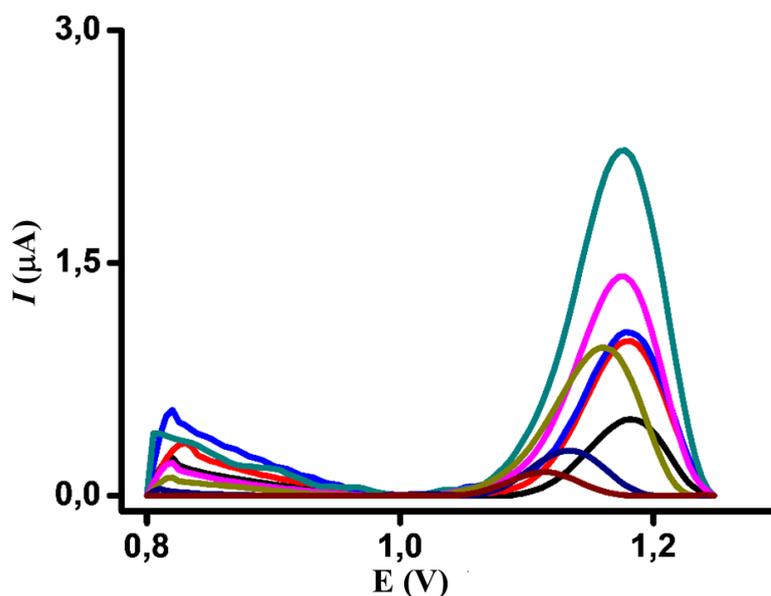
(v), **Figuras 10B**. A literatura ressalta que processos que apresentam linearidade entre corrente de pico e a velocidade de varredura são governados por adsorção (AGYEMAN, 2017), dessa forma a obtenção desses resultados indica que o processo para a reação redox do TA é governado predominantemente por adsorção das espécies na superfície do eletrodo.

O experimento foi realizado sem polimento da superfície do eletrodo entre as medidas voltamétricas, uma vez que não há existência de efeito de memória do TA na superfície do sensor, comportamento estudado anteriormente por Lourenço (2016), o que comprova que o CoPC – CPE pode ser utilizado repetidas vezes sem perda de atividade (LOURENÇO, 2016).

5.5 INFLUÊNCIA DA FREQUÊNCIA SOBRE A RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DO TA

Quando se trabalha com a calibração multivias é necessário obter dados em três vias, sendo cada sinal função de três fontes diferentes de variação, no caso dos dados voltamétricos temos a variação da amostra, do potencial de pico e, neste caso, a variação da frequência de pulso. Tendo em vista a influência da f na resposta eletrocatalítica do TA, a variação desse parâmetro foi investigada utilizando a SWV numa faixa de 5 a 110 Hz, com incrementos de 15 Hz entre cada frequência. O comportamento voltamétrico do TA frente a essa variação de frequência é mostrado na **Figura 11**.

Figura 11 - Estudo da frequência. Voltamograma SW com linha de base corrigida para o CoPC–CPE na presença de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TA em tampão acetato (pH 4,5); $f = 5 \text{ Hz}$ (—); $f = 20 \text{ Hz}$ (—); $f = 35 \text{ Hz}$ (—), $f = 50 \text{ Hz}$ (—); $f = 65 \text{ Hz}$ (—); $f = 80 \text{ Hz}$ (—); $f = 95 \text{ Hz}$ (—); $f = 110 \text{ Hz}$ (—), $\Delta E_p = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e janela de potencial de 0,8 a 1,25 V

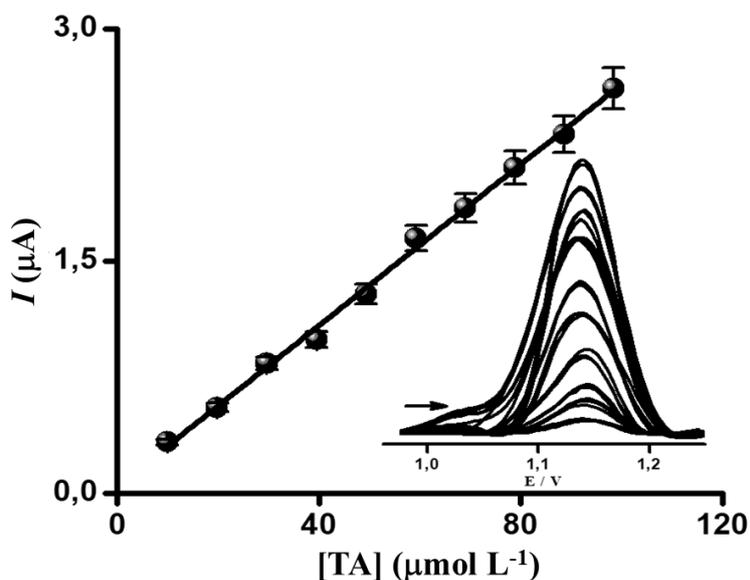


Este parâmetro interfere diretamente na sensibilidade do método devido sua contribuição para o ganho significativo na corrente de pico. Além dessa importante influência, o aumento da frequência provoca o deslocamento do sinal de resposta para potenciais mais positivos, corroborando com resultados da literatura (PEDROSA *et al.*, 2003; ZOSKI, 2006). Tendo em vista a atuação da frequência sobre as respostas voltamétricas, os conjuntos de dados de segunda ordem foram obtidos a partir da variação de oito frequências no intervalo mencionado acima. É importante destacar que, além do TA os interferentes estudados neste trabalho também sofrem influência da variação da frequência na resposta voltamétrica.

5.6 CURVA ANALÍTICA

A **Figura 12** mostra as respostas voltamétricas utilizando a voltametria SW e sua respectiva curva analítica, com todos os sinais voltamétricos obtidos em triplicatas sob as condições experimentais otimizadas em tampão acetato, pH 4,5. Foi observada uma excelente relação linear ($r = 0,9991$, $n = 10$) entre a corrente de pico e a concentração numa faixa de 10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($i/\mu\text{A} = 0,0043 (\pm 0,003) + 0,0026 (\pm 0,00005) [\text{TA}]/\mu\text{mol L}^{-1}$). Apesar da excelente relação linear obtida, um tratamento quimiométrico dos dados foi necessário para resolver a sobreposição dos sinais voltamétricos dos outros ácidos orgânicos (**Figura 13**) potencialmente presentes nas amostras de vinhos, sobre o sinal do TA.

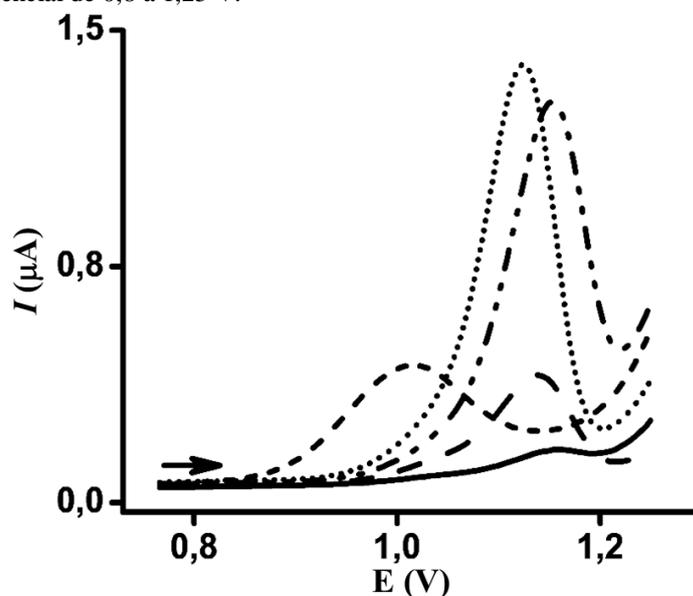
Figura 12 - Curva analítica SW. Adições sucessivas de TA (em triplicatas), em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; $f = 20$ Hz, acetato tampão 0,05 mol L^{-1} , pH = 4,5



5.7 INTERFERENTES

Assim como o TA, os ácidos cítrico, málico, láctico, ascórbico e succínico podem ser encontrados em vinhos em concentrações relativamente altas. Portanto, um estudo de interferência foi realizado para verificar o comportamento desses ácidos sobre o CoPC – CPE, exceto para o ácido ascórbico, uma vez que este é oxidado em potenciais mais baixos em eletrodos de carbono não modificados (SHAHROKHIAN E ASADIAN, 2010). Pode-se observar claramente na **Figura 13** que os ácidos citados também apresentam um sinal de oxidação eletrocatalítico em potenciais muito próximos ao sinal do TA sobre o CoPC – CPE.

Figura 13 - Estudo de interferentes. Voltamogramas SW de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos ácidos, tartárico (.....); cítrico (---); málico (- . -); láctico (- -) e succínico (—) em CoPC-CPE; $f = 20\text{Hz}$, $\Delta E_p = 20 \text{mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{mV}$ e janela de potencial de 0,8 a 1,25 V.



Este comportamento implica uma baixa seletividade do sensor para determinação do TA em amostra de vinho. Contudo, essa baixa seletividade pode ser superada empregando técnicas quimiométricas capazes de identificar o sinal do analito na presença de interferentes. É importante destacar que os fenóis, constituintes que também estão presentes nos vinhos tintos e brancos, não interferem no sinal voltamétrico do TA, uma vez que são oxidados em potenciais bem distantes do potencial de oxidação do TA em CoPC – CPE, além disso, o etanol, constituinte que também se encontra presente no vinho não apresenta resposta voltamétrica na superfície do sensor utilizado.

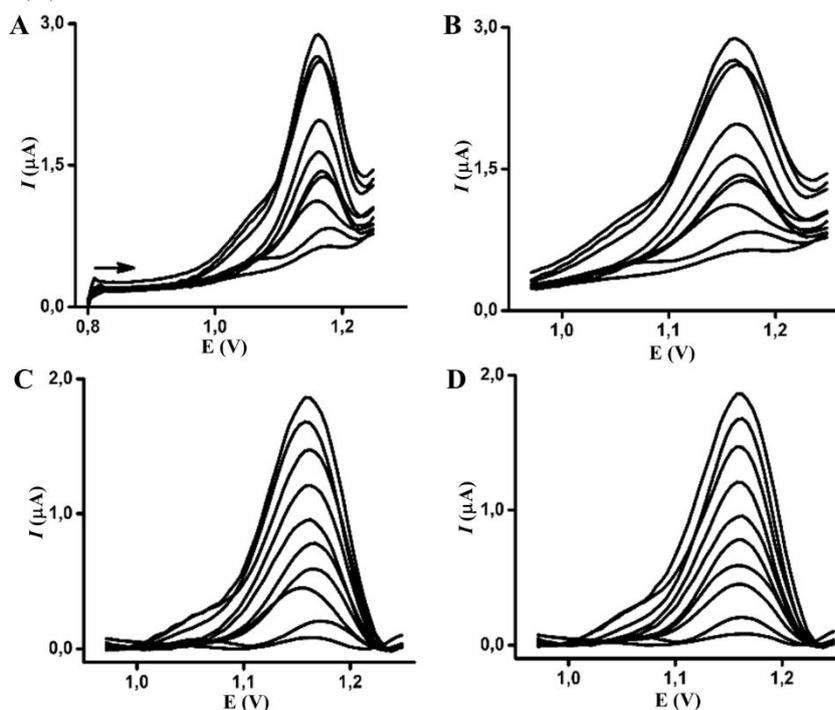
5.8 ESTUDOS QUIMIOMÉTRICOS

5.8.1 PRÉ-TRATAMENTO DOS DADOS

Algumas etapas de pré-tratamento dos dados voltamétricos foram necessárias para fazer uso das ferramentas quimiométricas utilizadas neste trabalho. Como pode ser visto na **Figura 14A**, a faixa de potencial de 0,80 V a 0,96 V não apresenta qualquer informação, e, por esta razão essa região foi eliminada e todos os tratamentos quimiométricos foram realizados utilizando a faixa de potencial de 0,96 V a 1,25 V.

É comum haver alteração na linha de base e deslocamento do potencial de pico nos dados voltamétricos registrados, mesmo quando a frequência é mantida constante, como pode ser observado na **Figura 14B**. Tais comportamentos podem ser atribuídos aos fenômenos que ocorrem na interface eletrodo/solução. Tendo em vista esse desempenho, se faz necessário o alinhamento dos dados em um mesmo potencial, contribuindo para obtenção de uma melhor linearidade dos sinais, etapa que se configura extremamente importante para os próximos tratamentos quimiométricos.

Figura 14 - Voltamogramas SW para os dados do conjunto de calibração na frequência de 20 Hz, tampão acetato 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5; concentrações de TA de 10 a 100 μmol L⁻¹. Dados brutos (A); dados na faixa de trabalho selecionada (B); após a correção da linha de base usando AsLSSR (C) e após o alinhamento usando o algoritmo COW (D).



A rotina AsLSSR foi empregada com sucesso para corrigir as mudanças na linha de base dos dados (**Figura 14C**), enquanto que o deslocamento de potencial de pico foi corrigido utilizando o algoritmo COW. É possível notar, nas **Figuras 14 C e D**, que o algoritmo foi eficaz para o alinhamento dos voltamogramas obtidos. Estes procedimentos foram utilizados antes de qualquer cálculo utilizando o U-PLS/RBL, aplicados para todos os dados obtidos por SWV.

5.8.2 MODELAGEM U-PLS/RBL

Agumas espécies presentes em amostras complexas podem sofrer processos redox em potenciais muito próximos ao potencial redox do analito, causando a sobreposição dos sinais voltamétricos, de forma que essa interferência causa o somatório dos sinais quando as espécies se encontram juntas, o que impossibilita a determinação exata do analito. Quando estamos diante de tal situação, uma alternativa é o uso da calibração de segunda ordem, possibilitando uma quantificação exata. Inicialmente, na modelagem U-PLS/RBL, o tensor referente ao conjunto de calibração (10x8x90) foi desdobrado originando uma matriz 10x720, convertendo as matrizes de cada medida em vetores. Na sequência, o número ótimo de fatores foi escolhido baseado no somatório quadrático do erro de predição (PRESS) *versus* o número de fatores incluídos no modelo U-PLS. Como observado na **Tabela 3**, o número ótimo de fatores de calibração escolhido para construir o modelo U-PLS/RBL do TA foi igual a um, com uma probabilidade menor que 75% e $F \geq 1$. Este resultado já era esperado, visto que no conjunto de calibração havia apenas soluções analíticas de TA.

Tabela 3 - Resultados da validação cruzada para o conjunto de calibração no U-PLS

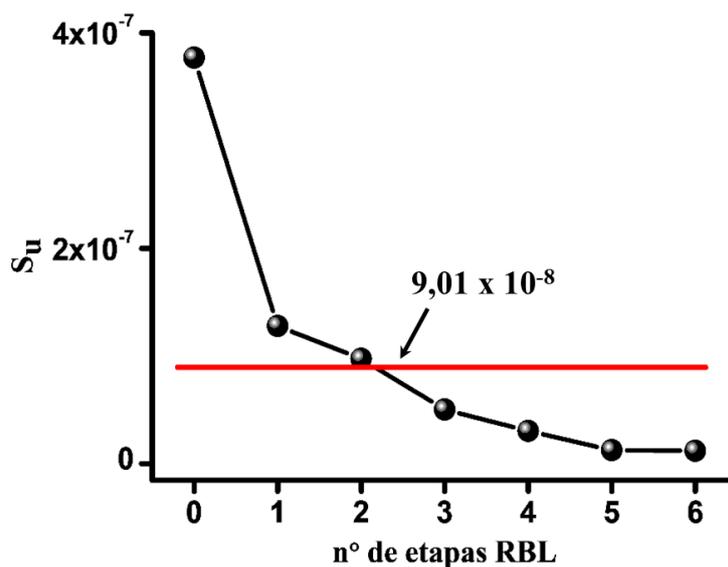
	Nº de fatores								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PRESS	15,71	17,14	30,55	21,57	14,75	14,58	14,26	14,22	13,27
F	1,18	1,29	2,30	1,62	1,11	1,09	1,07	1,07	-
P	0,69	0,78	0,97	0,83	0,56	0,54	0,50	0,49	-

P - Probabilidade inferior a 75% (isto é, $p < 0,75$); **F** - Distribuição F de Snedecor ($F = \text{PRESS}/\text{PRESMínimo}$), sendo $F \geq 1$ (HAALAND E THOMAS, 1988).

O tensor referente ao conjunto de validação (16x8x90) foi desdobrado para uma matriz 16x720 e justaposto às amostras de calibração ($X_{\text{val}}/X_{\text{Cal}}$). Em seguida, o número de espécies interferentes presentes no conjunto de validação foi estimado utilizando o RBL. Isso foi realizado examinando a variação de ruído instrumental das misturas de validação (S_u) a cada

etapa RBL adicionada, tendo como referência o valor do ruído instrumental estimado para o conjunto de calibração ($S_{cal}=9,01 \times 10^{-8}$), como pode ser observado na **Figura 15**.

Figura 15 - Variação de (—) S_u em função do nº de etapas RBL adicionadas para o TA tendo como referência o (—) S_{cal} .



Na **Figura 15** observa-se que, sem adicionar a etapa de RBL, S_u apresenta valores muito superiores ao S_{cal} , mostrando que há constituintes que não foram modelados na etapa de calibração. Em contrapartida, com a adição sucessiva das etapas RBL há uma redução significativa nos valores de S_u , aproximando seu valor ao valor de S_{cal} . Desta maneira, obtém-se explicação acerca da contribuição dos interferentes nas amostras de validação. Nota-se ainda que, a partir de três etapas RBL, o S_u apresenta valores menores do que o S_{cal} , indicado um sobre ajuste no modelo devido ao crescimento expressivo de etapas RBL. Portanto, a estabilização residual em torno do S_{cal} sugeriu que duas etapas RBL seriam necessárias para explicar os interferentes presentes no conjunto de validação e, dessa forma, o modelo U-PLS/RBL para o conjunto de validação foi construído usando um fator e duas etapas RBL. A relação entre as concentrações previstas e nominais de TA estão expostos na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Concentrações preditas e nominais ($\mu\text{mol L}^{-1}$) de TA no conjunto de validação por U-PLS/RBL

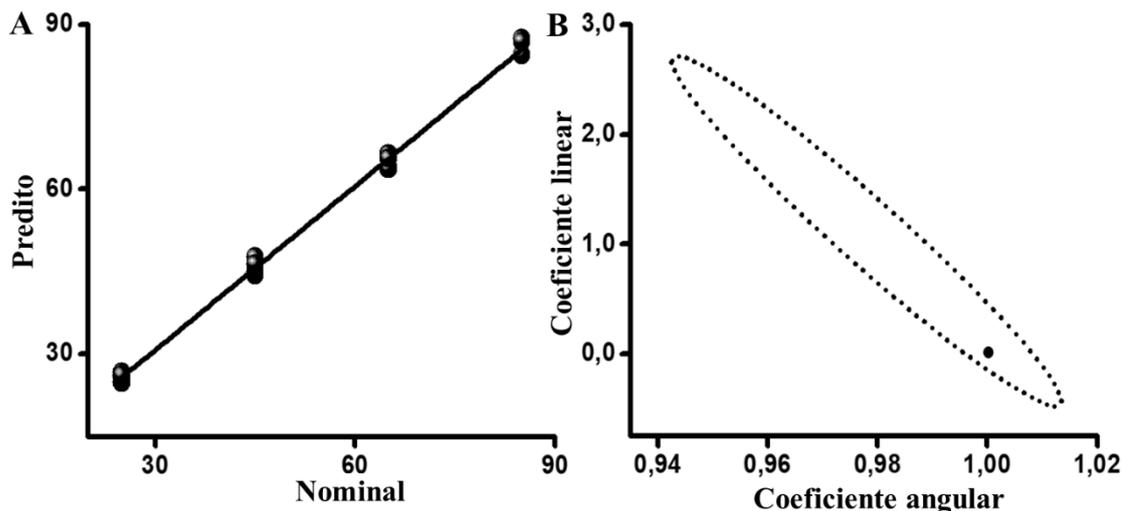
Amostras	Nominal	Predito	CV* (%)
1	25	26,62	3,08
2	25	24,89	3,72
3	25	25,80	3,40
4	25	26,12	3,93
5	45	44,39	2,13
6	45	47,69	2,19
7	45	45,05	3,17
8	45	46,38	1,83
9	65	63,96	2,47
10	65	66,47	3,71
11	65	63,72	2,31
12	65	65,61	2,05
13	85	84,49	2,06
14	85	84,52	2,62
15	85	87,47	2,65
16	85	86,87	2,56

*CV= Coeficiente de variação (n=3).

A **Tabela 4** mostra que uma excelente relação entre as concentrações previstas e nominais de TA foi obtida, demonstrando um ótimo desempenho do modelo para a quantificação do analito na presença de constituintes não modelados. Essa afirmação pode ser confirmada pela **Figura 16A**, que mostra o gráfico da concentração prevista versus a nominal obtida para o conjunto de validação, indicando um excelente ajuste do modelo U-PLS/RBL e pela **Figura 16B**, que apresenta a região elíptica de confiança conjunta (EJCR) contendo o ponto ideal (inclinação = 1 e intercepto = 0), sugerindo que o modelo U-PLS/RBL não apresentou tendência significativa para nível de confiança de 95% (GHOLIVAND *et al.*, 2015).

Além disso, um modelo ajustado permite o desenvolvimento de metodologias com figuras de mérito favoráveis, tais como, um coeficiente de correlação (r) de 0,9991, um erro quadrático médio (RMSE) de $2,50 \mu\text{mol L}^{-1}$, um erro relativo de predição (REP) de 4,55%, sensibilidade (SEN) de $0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$, sensibilidade analítica (γ^{-1}) de $0,56 \mu\text{mol L}^{-1}$, LOD de $7,29 \mu\text{mol L}^{-1}$ e LOQ de $22,1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

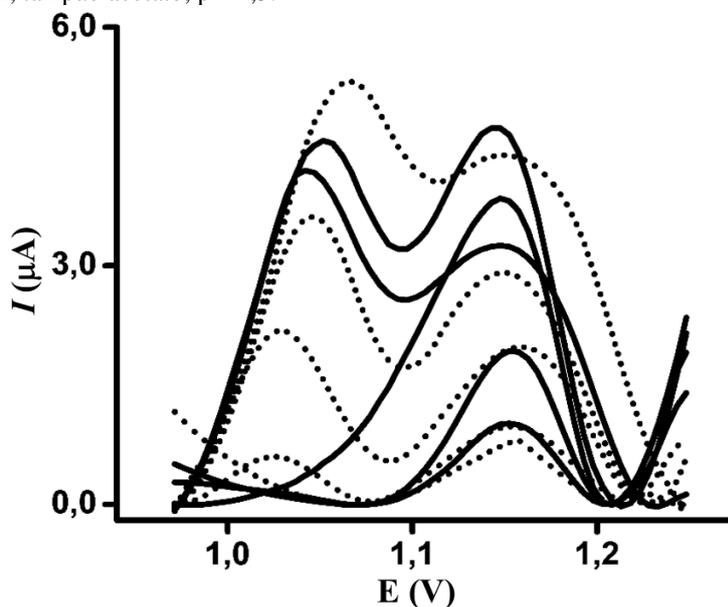
Figura 16 - Gráfico de concentração prevista x nominal para o TA (A) e EJCR (B) para o modelo U-PLS/RBL obtido no conjunto de validação. O ponto na EJCR marca o ponto teórico (slope = 1 e intercepto = 0)



5.8.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE VINHO

A **Figura 17** apresenta voltamogramas de SW pré-processados relacionados à oxidação electrocatalítica do TA nas amostras. A onda electrocatalítica correspondente à oxidação do TA pode ser observada em aproximadamente 1,15 V, juntamente com outros ácidos orgânicos como, MA, LA e SA, enquanto a primeira onda pode estar relacionada à electrocatálise do CA, uma vez que esse ácido apresenta sinal de oxidação nessa faixa de potencial sobre o CPE – CoPC (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Figura 17 - Voltamogramas SW pré-processados de amostras de vinhos brancos (—) e vinhos tintos (.....); $f=20$ Hz, tampão acetato, pH 4,5.



Através do modelo U-PLS/RBL, foi possível determinar a quantidade de TA nas amostras de vinho, obtendo uma faixa de 2,2 a 26,36 mmol L⁻¹ (0,33 a 3,96 g L⁻¹), (**Tabela 5**). Os valores encontrados estão de acordo com a literatura ([KRITSUNANKUL et al., 2009](#); [OLIVEIRA et al., 2010](#); [ZERAVIK et al., 2016](#)).

Tabela 5 - Concentrações de TA (g L⁻¹) em vinhos tintos e brancos determinados pelo método proposto

Vinhos	TA (g L⁻¹)	CV* (%)
Vinho branco – Chenin Blanc (2011, Brasil)	2,29	1,23
Vinho branco – Moscato Canelli (2015, Brasil)	3,06	1,34
Vinho branco – Sauvignon Blanc (2012, Brasil)	3,19	1,39
Vinho branco – Moscato (2016, Brasil)	2,89	1,28
Vinho tinto – Mesa (2016, Brasil)	1,36	1,44
Vinho branco – Chardonnay (2014, França)	2,63	1,89
Vinho tinto – Mesa (2015, França)	2,11	0,98
Vinho tinto – Cabernet Sauvignon (2015, Chile)	3,96	1,49
Vinho tinto – Mesa (2014, Portugal)	0,33	1,89
Vinho tinto – Malbec, (2016, Argentina)	0,70	1,34

*CV = Coeficiente de variação (n=3)

5.8.4 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO

Para avaliar a exatidão do método proposto, foi realizado estudo de recuperação em três níveis de concentração. Sendo executado em três amostras de vinho tinto e três amostras de vinho branco, usando o método de adição padrão em triplicata. Como pode ser visto na **Tabela 6**, foram obtidas excelentes recuperações, indicando que o método proposto foi aplicado com sucesso para determinação de TA em amostras complexas como vinho sem qualquer pré-tratamento e superando as sobreposições dos constituintes não calibrados.

Tabela 6 - Estudo de recuperações de TA em vinhos usando o método proposto

Amostras de vinhos	Concentração de TA (mg L ⁻¹)		Recuperação o (%)	Médias das recuperações ±CV*(%)
	Adicionada	Encontrada ±CV*(%)		
Vinho branco 1	3,00	5,20 ± 1,07	96,79	100,27 ± 1,07
	7,50	9,98 ± 1,50	102,44	
	13,50	16,01 ± 0,65	101,57	
Vinho branco 2	3,00	6,27 ± 1,81	107,03	98,62 ± 0,78
	7,50	10,25 ± 0,44	95,89	
	13,50	15,61 ± 0,1	92,94	
Vinho branco 3	3,00	6,27 ± 1,78	102,32	102,43 ± 1,29
	7,50	11,16 ± 1,23	106,12	
	13,50	16,55 ± 0,89	98,86	
Vinho tinto 1	3,00	5,05 ± 0,19	97,85	101,21 ± 0,70
	7,50	9,83 ± 1,31	102,87	
	13,50	16,01 ± 0,60	102,92	
Vinho tinto 2	3,00	6,59 ± 0,21	87,94	96,41 ± 0,50
	7,50	12,08 ± 1,10	108,26	
	13,50	16,52 ± 0,21	93,03	
Vinho tinto 3	3,00	4,74 ± 0,71	103,70	98,39 ± 0,66
	7,50	8,62 ± 0,71	93,08	
	13,50	14,92 ± 0,56	98,39	

*CV = Coeficiente de variação (n=3).

Para fins comparativos, os resultados obtidos para determinação de TA utilizando a Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternados (MCR – ALS) encontram-se no **Apêndice A**, onde é possível observar resultados menos satisfatórios daqueles obtidos a partir da modelagem U – PLS/RBL.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstra que o TA pode ser oxidado eletroquimicamente em CPE modificado com CoPC, apresentando uma onda de oxidação eletrocatalítica em aproximadamente 1,15 V. Através dos estudos, observou-se que o potencial de pico e a sensibilidade analítica são dependentes do pH, obtendo máxima corrente de pico em pH 4,5 por SWV. Apesar da excelente resposta linear do TA com o CoPC-CPE, outros ácidos de baixo peso molecular, geralmente se encontram presentes em vinhos dentro de uma faixa de concentração muito próxima da concentração de TA, o que limita a seletividade do sensor proposto. No entanto, esta limitação foi contornada utilizando o modelo U-PLS/RBL para quantificar com precisão o TA obtendo uma faixa de 9,06 a 26,38 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de interferentes além disso, foram obtidos excelentes valores de LOD e LOQ, 7,29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 22,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.



Capítulo 4
Determinação de aminas
biogênicas em vinhos

7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar eletrodos de pasta de carbono modificado com diferentes ftalocianinas metálicas e investigar o comportamento eletroquímico das aminas biogênicas;
- Estudar a percentagem da ftalocianina de níquel na pasta de carbono;
- Otimizar as condições experimentais que norteiam a análise voltamétrica;
- Avaliar o desempenho do sensor desenvolvido para a determinação simultânea de histamina e triptamina em vinhos.

8 EXPERIMENTAL

8.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (Milli-Q, condutividade de $0,1 \leq \mu\text{S cm}^{-1}$). Os reagentes para preparo das soluções tampão, Hist, Tip, hidroquinona, etanol, óleo mineral, pó de grafite ($\leq 20 \mu\text{m}$) e as PCs, H₂PC, CoPC, CuPC, ZnPC e NiPC são de pureza analítica, adquiridas da Sigma-Aldrich e a acetona (99,5%) obtida da Quemis. Na **Tabela 7** estão mostradas as composições das soluções tampão usadas como eletrólito de suporte. Para os estudos eletroquímicos, as soluções estoques de Hist e Tip foram preparadas diariamente no eletrólito suporte com diluições subsequentes na célula eletroquímica.

Tabela 7 - Soluções usadas como eletrólito suporte (adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2007).

pH	Composição (Volume em mL)
3,5	0,2 mol L ⁻¹ CH ₃ COONa (3,7) + 0,2 mol L ⁻¹ CH ₃ COOH (46,3) + H ₂ O (50)
4,5	0,1 mol L ⁻¹ CH ₃ COONa (50) + 0,1 mol L ⁻¹ CH ₃ COOH (50)
6,1	0,2 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (6,15) + 0,2 mol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ (43,85) + H ₂ O (50)
7,2	0,2 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (30,5) + 0,2 mol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ (19,5) + H ₂ O (50)
8,6	0,2 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (47,35) + 0,2 mol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ (2,65) + H ₂ O (50)
9,5	0,025 mol L ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ .10 H ₂ O (50) + 0,1 mol L ⁻¹ NaOH (3,0) + H ₂ O (47)

8.2 INSTRUMENTAÇÃO E PROGRAMA DE CONTROLE

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Eco Chemie Autolab (Modelo PGSTAT 302N) (**Figura 5 – Seção 3.2**) controlado pelo software NOVA 2.1.2. Os estudos de CV, SWV e DPV foram realizados utilizando uma célula eletroquímica de compartimento único de 40 mL com CPE modificado e não modificado de aproximadamente 3,0 mm de diâmetro, um eletrodo de Ag/AgCl (KCl, 3,0 mol L⁻¹) e um bastão carbono vítreo, como eletrodos de trabalho, de referência e auxiliar, respectivamente.

8.3 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO

Os eletrodos de pasta de carbono modificados com as PCs foram preparados seguindo quatro etapas, que envolvem desde o preparo da pasta a confecção do sensor, a saber: a)

mistura em almofariz de 59% de pó de carbono e 1% da PC por 10 minutos; b) Dispersão da mistura em acetona sob agitação até a completa evaporação do solvente em temperatura ambiente; c) Adição de 40% de óleo mineral; d) Montagem dos sensores (PC – CPE) a partir da inserção da mistura em um tubo de vidro com diâmetro interno de aproximadamente 3 mm contendo um fio de cobre contato elétrico no lado oposto.

8.4 PROCEDIMENTO ELETROQUÍMICO

Antes de cada medida, a superfície do eletrodo foi polida utilizando um papel manteiga e submetida a um pré-tratamento eletroquímico, realizando-se 20 varreduras sucessivas no eletrólito suporte, utilizando a SWV, para obter uma melhor linha de base. Nenhum tratamento adicional foi necessário para regenerar a superfície do eletrodo entre uma medida e outra.

Os estudos para investigação do comportamento redox das ABs, comportamento eletroquímico do NiPC-CP, influência da percentagem do modificador, curva analítica, efeito de memória, determinação simultânea das ABs nos vinhos e o estudo de recuperação foram realizados utilizando a SWV, a CV foi utilizada para realizar o estudo de velocidade, e a DPV foi utilizada para avaliar a influência do pH sobre a resposta voltamétrica das ABs, sendo todas as medidas realizadas em triplicata. A curva analítica foi construída utilizando-se diluições diretamente na célula eletroquímica, numa faixa de concentrações de 0,49 a 3,93 ng mL⁻¹ para Trip e 0,37 a 2,9 µg mL⁻¹ para Hist, com adições consecutivas usando o método de adição de padrão. Os parâmetros experimentais estudados nas técnicas voltamétricas são descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Parâmetros experimentais estudados

Parâmetros	Voltametria cíclica	Voltametria de onda quadrada	Voltametria de pulso diferencial
Janela de potencial	0,4 a 1,45 V	0,4 a 1,45 V	0,5 V a 1,45 V
Velocidade de varredura	25 a 200 mV	-	-
Incremento de potencial	-	1 - 10 mV	5 mV
Amplitude de pulso	-	10 - 100 mV	25 mV
Frequência	-	10 - 150 Hz	-
Tempo de modulação	-	-	50 ms

8.5 INTERFERENTES

Como foi mencionado anteriormente, o vinho é uma bebida composta de diferentes constituintes, a exemplo dos ácidos MA, LA, TA, AS, de algumas ABs como, putrescina, cadaverina e a 2-feniletilamina, álcool e polifenóis como por exemplo a hidroquinona. Dessa forma, esse experimento foi realizado com o objetivo de investigar a eletroatividade dessas espécies sobre o NiPC – CPE nas condições experimentais otimizadas para a determinação simultânea da Trip e Hist.

8.6 AMOSTRAS DE VINHO E ESTUDO DE RECUPERAÇÃO

As nove amostras de vinhos de diferentes tipos de uvas e origens, mostradas na **Tabela 9**, foram adquiridas no comércio local da cidade de João Pessoa-PB.

Tabela 9 - Identificação e descrição dos vinhos branco e tintos

Vinho	Tipo de uva	Safra	Origem
Branco	Mesa	2018	Brasil
	Tannat/Merlot	2017	Uruguai
	Vitis viniferas	2018	Portugal
	Mesa	2016	Portugal
Tintos	Vitis viniferas	2017	Argentina
	Shiraz	2015	Espanha
	Mesa	2015	França
	Cabernet Sauvignon	2017	Chile
	Mesa	2016	Portugal

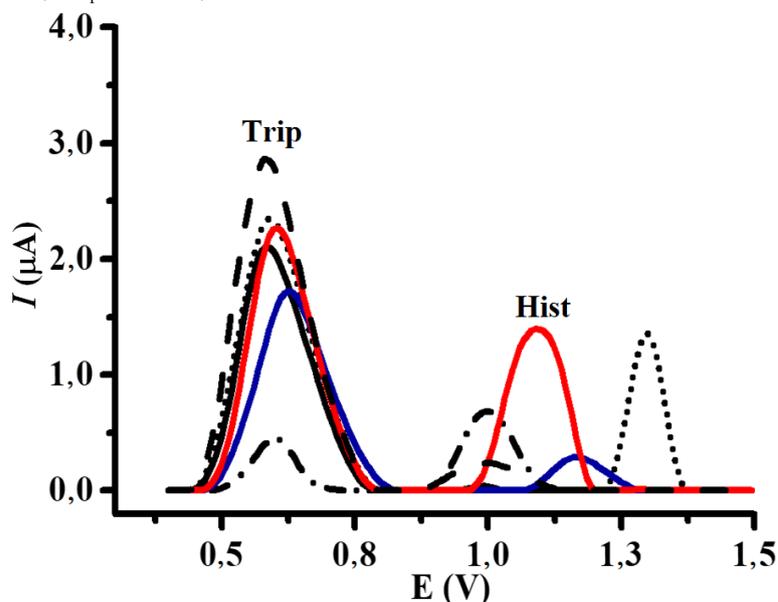
Para as medidas voltamétricas, foi adicionado 100 μL de cada amostra diretamente na célula eletroquímica contendo 20 mL do eletrólito suporte. O método dispensou qualquer tratamento prévio das amostras e o estudo de recuperação foi realizado empregado o método de adição de padrão, adicionando três níveis de concentração das aminas, 0,73; 1,46 e 2,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Hist e 9,83; 19,65 e 29,46 ng mL^{-1} para a Trip, na célula eletroquímica.

9 RESULTADOS E DISCUSSÕES

9.1 COMPORTAMENTO REDOX DAS AMINAS EM MPCs – CPE E CPE

A oxidação eletroquímica de Trip e Hist foi demonstrada através dos sinais SWV registrados utilizando um CPE não modificado e em CPEs modificados com 1% de diferentes PCs, H₂PC e MPCs, como mostrado na **Figura 18**.

Figura 18 - Comportamento eletroquímico das aminas em diferentes superfícies de eletrodos em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH = 8,5. Voltamogramas SW de 9,83 µg mL⁻¹ de Trip e 18,40 µg mL⁻¹ de Hist no CPE (— · —); 3% H₂PC-CPE (—); CuPC-CPE (.....); ZnPC-CPE (- -); CoPC - CPE (—) e 1% NiPC - CPE (—); $f = 50$ Hz, $\Delta E_p = 30$ mV, $\Delta E_s = 7$ mV



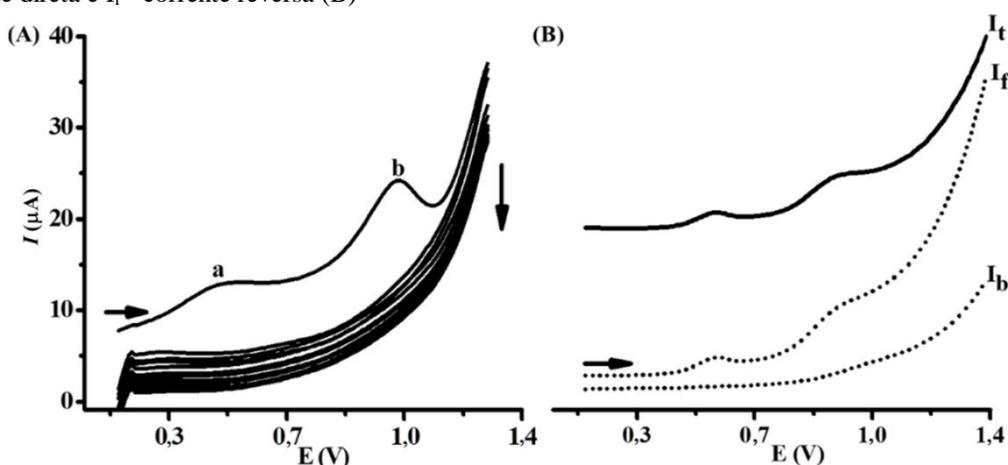
Em todos os voltamogramas, é possível observar que a Trip oxida em potencial de pico anódico em torno de 0,75 V em todas as superfícies de eletrodos utilizadas. Por outro lado, a Hist oxida em diferentes potenciais de pico anódico, exigindo maior energia de ativação para promover sua oxidação, especialmente ao utilizar a CuPC como mediador de elétrons (o sinal de oxidação mudou positivamente para +1,35 V). Além disso, tanto a imobilização da CuPC, quanto a imobilização da NiPC nos eletrodos de trabalho exerceu um efeito electrocatalítico favorecendo a reação de oxidação das duas aminas, no entanto foi observado um retardo na oxidação da Hist quando empregou a CuPC como agente modificador. Já o uso da H₂PC, CoPC e ZnPC, desfavorece a reação da Hist, quando comparado à oxidação dessa espécie sobre o CPE simples, embora tenha favorecido a electrocatálise da reação de oxidação Trip. Portanto, diante dos resultados obtidos escolheu-se trabalhar com a NiPC,

por esta contribuir tanto para o ganho significativo na resposta analítica (em termos de pico de corrente e resolução) para os dois analitos e redução do potencial de oxidação para a Hist, além disso o distanciamento dos potenciais de pico aprimorou a determinação simultânea dos analitos sem a possível evidência de sobreposição. A partir dos resultados obtidos foi possível observar a importância da PC metalizada com o níquel para promover a eletrocatalise das aminas em comparação com a H₂PC, uma vez que essa PC promove a oxidação da Trip e Hist com perda significativa da corrente de pico e retardo da oxidação de Hist. A diferença no comportamento eletroquímico das PCs, bem como o potencial de eletrocatalisar as diferentes espécies, está relacionado com a presença do centro metálico no complexo (GÖK *et al.*, 2016; KURT *et al.*, 2017), como foi discutido no item 5.1.

9.2 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO NiPC – CPE

Voltamogramas SW de NiPC – CPE em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 8,5, na ausência das ABs, são mostrados na **Figura 19**, é importante ressaltar que nenhum processo redox foi observado para um CPE simples na faixa de potencial estudada (voltamograma não mostrado). Por outro lado, dois processos de oxidação (**Figura 19B**) são observados com potenciais de pico anódicos em 0,5 V e 1,0 V para a NiPC immobilizada no CPE. Esse comportamento já foi relatado na literatura em que as ondas foram atribuídas à processos redox que ocorrem nos anéis isoindol da ftalocianina (a) e no centro metálico (b), respectivamente (BROWN *et al.*, 2018).

Figura 19 - Comportamento eletroquímico de NiPC – CPE em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH = 8,5. Vinte voltamogramas de SW sucessivos (A) e primeira varredura do NiPC, I_t - corrente total, I_d - corrente direta e I_r - corrente reversa (B)



Paralelamente, observa-se um forte desaparecimento das ondas “a” e “b” após 20 varreduras sucessivas utilizando a SWV, o que pode estar associado à irreversibilidade do

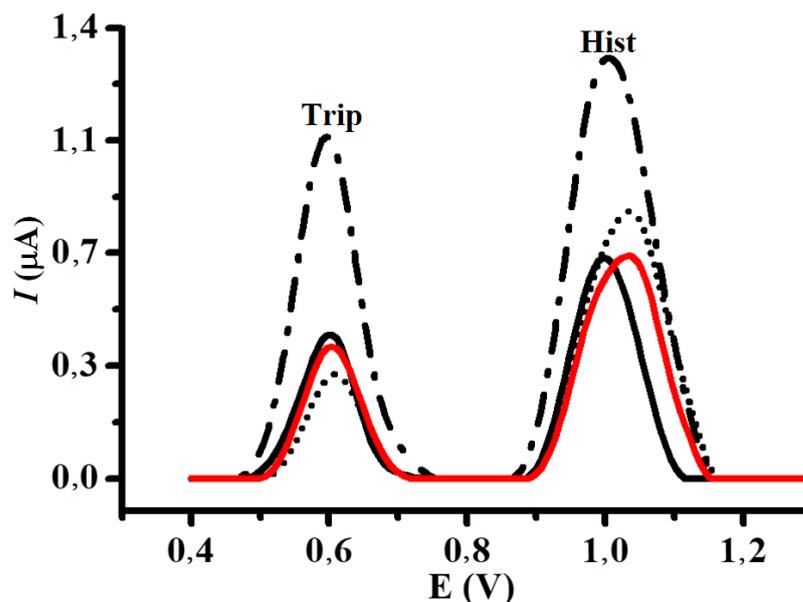
processo “a”. Esse tratamento eletroquímico resultou em uma linha de base adequada para o NiPC – CPE, contribuindo para um melhor desempenho analítico do eletrodo modificado, como será visto ao longo deste trabalho.

Tendo em vista o comportamento redox do NiPC – PCE, (**Figura 19A**) e o potencial de resposta das ABs, podemos atribuir a oxidação eletrocatalítica dos analitos à reação do par redox Ni(II)/Ni(III) juntamente com processos redox que ocorrem nos anéis da PC.

9.3 INFLUÊNCIA DA PERCENTAGEM DO MODIFICADOR

Apesar das aminas em estudo apresentarem eletroatividade no CPE, o uso de mediadores de elétrons facilita a oxidação de ambas, contribuindo para o aumento significativo da corrente de pico, como pode ser visto na **Figura 20**. Assim, a influência da resposta voltamétrica foi investigada pela SWV em meio tampão fosfato, pH 8,5 utilizando diferentes porcentagens de NiPC para obter de uma relação ideal entre o pó de carbono e as quantidades de NiPC no eletrodo.

Figura 20 - Estudo da percentagem do modificador. Voltamogramas SW em meio tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 8,5), Hist $18,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e Trip $1,96 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ em diferentes quantidades de NiPC: 0% (—); 1% (— . .); 3% (.....); e 5% (—) NiPC; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 7 \text{ mV}$



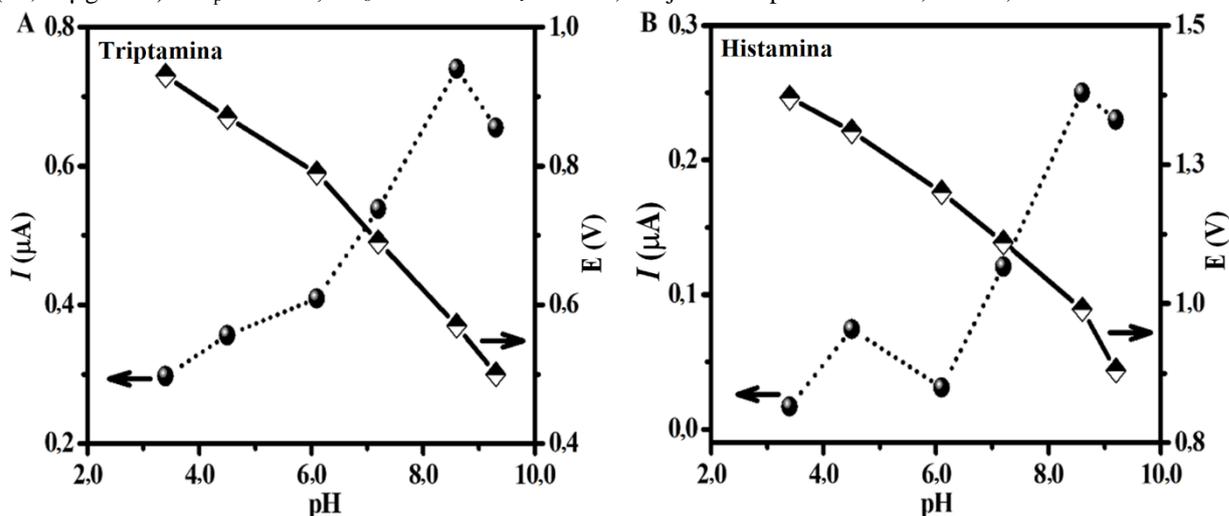
Como podemos observar na **Figura 20**, a NiPC exerceu um efeito eletrocatalítico com maior sensibilidade na resposta voltamétrica das aminas ao usar 1% de NiPC em comparação com valores mais altos de NiPC e com o CPE não modificado, dessa forma os estudos subsequentes foram realizados utilizando 1% da NiPC para modificar o CPE. Tal

comportamento pode está relacionado com o aumento da resistência elétrica no interior do sensor. É importante destacar que apenas a intensidade de corrente de pico sofreu influência significativa, o potencial de pico não apresentou variações com a variação da percentagem de NiPC no CPE.

9.4 INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DAS ABs

O efeito do pH foi investigado utilizando a DPV em faixas ácidas e alcalinas (3,5 a 9,5) para esse propósito, as soluções Hist e Trip foram usadas em concentrações de $18,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,96 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Observa-se que a corrente de pico e o potencial de oxidação das aminas são influenciados pela variação do pH, como pode ser visto na **Figura 21**.

Figura 21 - Comportamento voltamétrico de aminas biogênicas sobre o NiPC – CPE em DPV com variação de pH. Influência do pH na corrente de pico e potencial de oxidação de (A) Trip ($1,96 \mu\text{g mL}^{-1}$) e (B) Hist ($18,40 \mu\text{g mL}^{-1}$). $\Delta E_p = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $\Delta E_t = 50 \text{ ms}$, em janela de potencial de $0,5 \text{ V}$ à $1,45 \text{ V}$

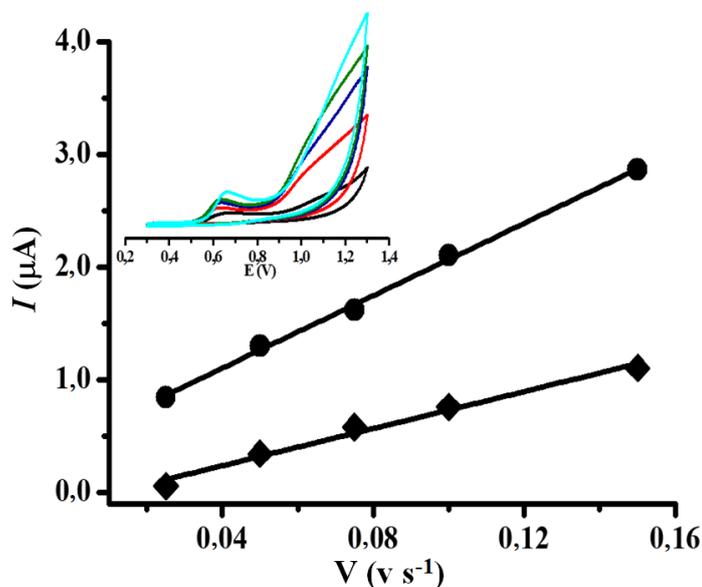


Como pode ser visto na **Figura 21**, os analitos apresentaram valores mais altos de corrente de pico em pH 8,5, sendo este escolhido para estudos posteriores. Experimentalmente, foram obtidos valores $W_{1/2}$ de 65 mV e 42 mV para Trip e Hist, respectivamente, indicando que a reação eletrocatalítica para Trip é governada por apenas um elétron e para Hist por dois elétrons. A partir da relação linear entre E_p vs. pH, observa-se uma inclinação de -53 mV/pH para Trip e $-69,4 \text{ mV/pH}$ para Hist, indicando que o mecanismo de reação para as aminas tem o mesmo número de prótons e elétrons, $1e^-/1H^+$ para Trip e $2e^-/2H^+$ para a Hist, uma vez que as inclinações obtidas apresentam valores próximos a 60 mV, conforme indicado na literatura (BARD *et al.*, 1944; SMITH, 2006).

9.5 ESTUDO DE VELOCIDADE

A natureza do transporte de massa para a superfície do NiPC – CPE e o grau de reversibilidade da reação redox das aminas, estudada com soluções recém preparadas de 36,8 e 19,67 mg L⁻¹ de Hist e Trip, respectivamente, em tampão fosfato (pH = 8,5) e faixa de potencial de 0,4 a 1,45 V, foi realizada utilizando a CV em diferentes velocidades de varredura (25, 50, 75, 150 e 200 mV), como mostrado na **Figura 22**. Os voltamogramas foram obtidos sem haver necessidade da renovação da superfície do eletrodo entre as medidas.

Figura 22 - Estudo de velocidade para Hist e Trip em voltametria cíclica e tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH = 8,5. Relação entre I_p vs. v , para (●) Trip (19,67 mg L⁻¹) e (◆) Hist (36,8 mg L⁻¹). Inserção: voltamogramas cíclicos correspondentes



Como pode ser visto na **Figura 22**, é possível observar dois sinais de resposta em potenciais de picos anódicos, um em aproximadamente 0,75 V, referente a oxidação da Trip e um segundo sinal em aproximadamente 1,0 V, e nenhuma resposta voltamétrica foi observada em potenciais de picos catódicos, indicando que as reações não apresentam processos de redução. Paralelamente, a influência da velocidade de varredura sobre a corrente de pico das aminas mostrou uma relação linear entre a I_p vs. v (V S^{-1}), indicando que a reação de oxidação eletrocatalítica das aminas é controlada predominantemente pela adsorção de espécies na superfície do eletrodo.

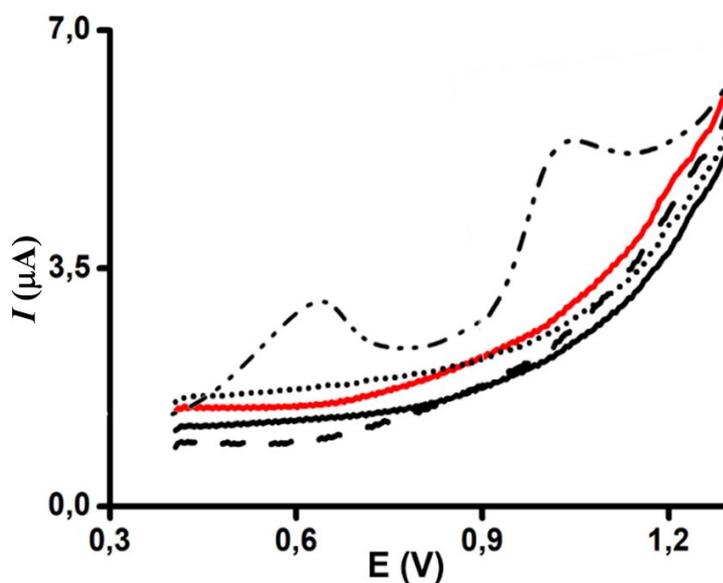
9.6 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS

Os parâmetros voltamétricos, como a frequência de aplicação de pulso de potencial, amplitude de pulso e o incremento de varredura, apresentam forte influência na corrente de pico (intensidade), que determina a sensibilidade do método desenvolvido e na seletividade (largura do meio pico). Portanto, esses parâmetros foram avaliados de forma univariada para obter melhores respostas em termos de corrente de pico e melhor resolução do sinal analítico. Para este estudo, foi utilizada uma solução contendo $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Trip e $1,84 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hist em tampão fosfato, pH 8,5. Os valores ótimos dos parâmetros SWV foram, $f = 50 \text{ Hz}$, $E\Delta_s = 7 \text{ mV}$ e $E\Delta_p = 30 \text{ mV}$.

9.7 INTERFERENTES

Foi verificada a eletroatividade de outras espécies que podem estar presentes nos vinhos, as quais poderiam interferir nas respostas voltamétrica das ABs, chegando a ser uma limitação para o método desenvolvido. Portanto, o estudo de interferentes foi realizado utilizando padrões dos ácidos, MA, LA, CA, TA e AS, outras ABs, à exemplo da putrescina, cadaverina e 2-feniletilamina, etanol e um composto fenólico, a hidroquinona (**Figura 23**).

Figura 23 - Estudo de interferentes. Voltamogramas SW dos ácidos, MA, LA, CA, TA e AS (—); Trip e Hist (-.-.); álcool (----); putrescina, cadaverina e 2-feniletilamina (—) e hidroquinona (.....) em NiPC – CPE, tampão fosfato, pH 8,5; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 7 \text{ mV}$, e janela de potencial de 0,45 a 1,3 V

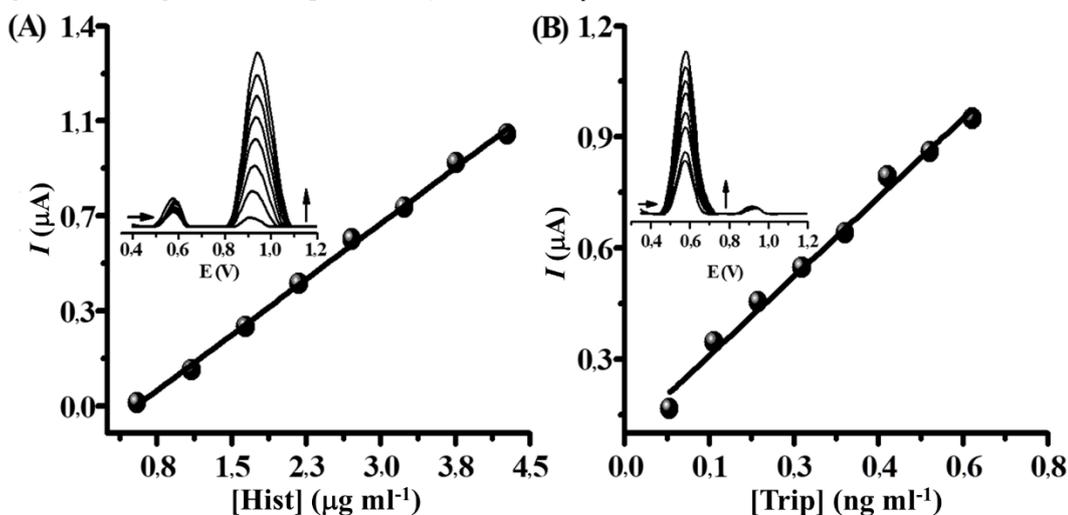


Como pode ser visto na **Figura 23**, nenhuma das espécies estudadas (concentração na faixa de mg L^{-1}), exceto os analitos de interesse, apresentaram qualquer resposta eletroquímica sobre sensor desenvolvido (NiPC – CPE) nas condições estabelecidas para a determinação simultânea das aminas. Tal comportamento comprova a alta seletividade do sensor, podendo este ser utilizado para determinação simultânea da Trip e Hist em amostras de vinhos sem haver a necessidade do uso de métodos de preparo de amostra.

9.8 CURVA ANALÍTICA

Inicialmente, a curva analítica para a Hist foi obtida fixando a concentração em $0,16 \text{ ng mL}^{-1}$ de Trip e fazendo adições sucessivas de Hist que variou de $0,55 - 4,28 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Como pode ser visto na **Figura 24A**, a corrente de pico anódica para Hist aumentou proporcionalmente à concentração, enquanto que a Trip permaneceu praticamente constante, demonstrando que o sensor apresenta boa estabilidade. Posteriormente, a concentração de Trip variou de $0,08 - 0,76 \text{ ng mL}^{-1}$ e a concentração de Hist permaneceu constante em $1,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Como pode ser visto na **Figura 24B**, o pico de corrente para Trip também aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração.

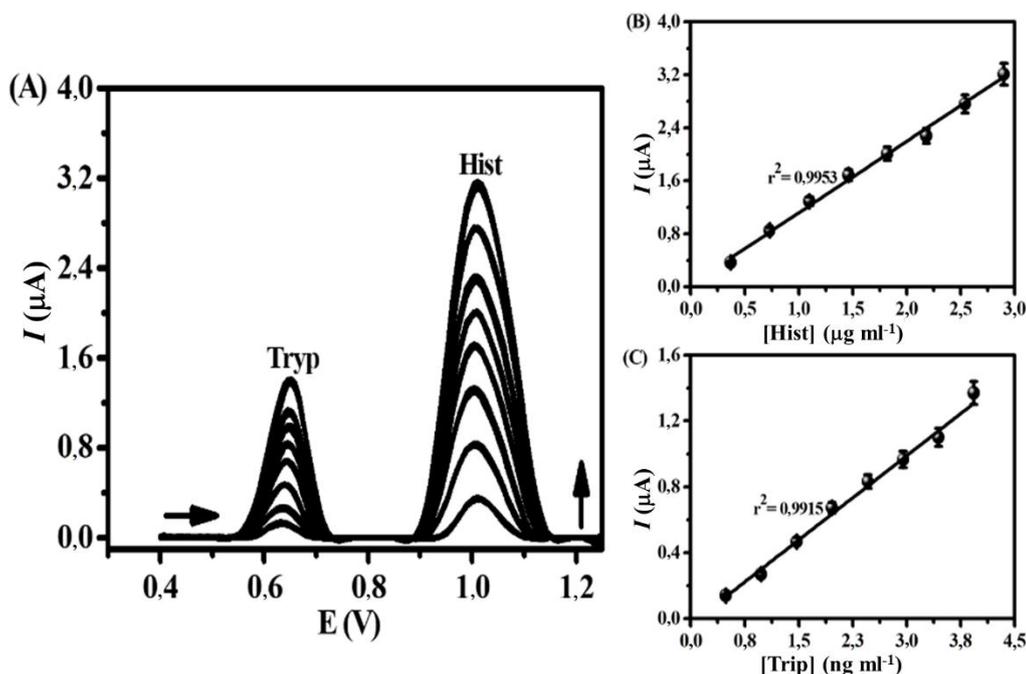
Figura 24 - Curva analítica obtida para diferentes concentrações de: (A) Hist ($0,55 - 4,28 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e Trip com concentração fixa de $0,16 \text{ ng mL}^{-1}$; (B) Trip ($0,08 - 0,76 \text{ ng mL}^{-1}$), e Hist com concentração fixa de $1,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Inserções: voltamogramas correspondentes; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 7 \text{ mV}$



A partir desses resultados, podemos inferir que a Trip e a Hist não interferem entre si e podem ser determinadas simultaneamente sobre o sensor desenvolvido. Após esses estudos, foi obtida uma curva de calibração com faixa linear de $0,49 - 3,93 \text{ ng mL}^{-1}$ para

Trip e $0,37 - 2,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Hist, com adições sucessivas das duas amins usando o NiPC – CPE em tampão fosfato (pH = 8,5), como mostrado na **Figura 25**.

Figura 25 - Curva analítica SW. (A) Voltamogramas obtidos usando o NiPC – CPE para várias concentrações de Trip ($0,49 - 3,93 \text{ ng mL}^{-1}$) e Hist ($0,37 - 2,9 \mu\text{g mL}^{-1}$); (B) Curva de calibração obtido para Hist; (C) Curva de calibração obtido para Trip; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 7 \text{ mV}$



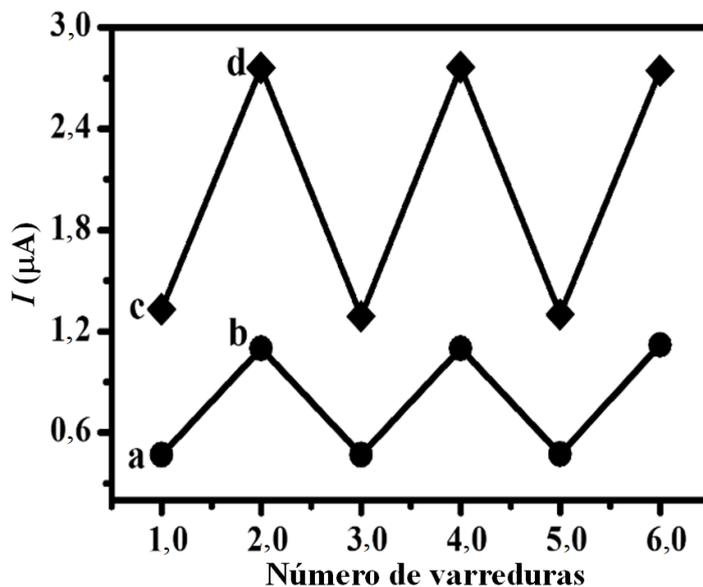
A **Figura 25** mostra os voltamogramas SW e suas respectivas curvas analíticas para Trip e Hist em diferentes concentrações, sob condições experimentais otimizadas. Onde observa-se uma excelente relação linear ($r^2 = 0,9915$ e $r^2 = 0,9953$, $n = 8$) entre a corrente de pico e a concentração da Trip e Hist, respectivamente. As equações obtidas para as curvas de calibração foram: $I_p (\mu\text{A}) = 0,0057 (\pm 0,0032) + 0,036 (\pm 0,0013) [\text{Trip ng mL}^{-1}]$ e $I_p (\mu\text{A}) = 0,00432 (\pm 0,0047) + 1,13 (\pm 0,0032) [\text{Hist}]/\mu\text{g mL}^{-1}$ e os LOD encontrados foram de $0,168 \text{ ng mL}^{-1}$ e $0,038 \mu\text{g mL}^{-1}$ e LOQ de $0,509 \text{ ng mL}^{-1}$ e $0,115 \mu\text{g mL}^{-1}$, para Trip e Hist, respectivamente.

9.9 EFEITO DE MEMÓRIA

A SWV foi utilizada para verificar a existência do efeito de memória dos analitos na superfície do sensor desenvolvido. Para isso, foram realizadas varreduras consecutivas para duas soluções de diferentes concentrações de Hist e Trip, onde o sensor foi lavado apenas com água deionizada entre cada varredura. Como pode ser visto na **Figura 26**, o sensor não mostrou nenhum efeito de memória, dada a reprodutibilidade das correntes de pico obtidas

para as diferentes concentrações dos analitos. A partir deste estudo, podemos dizer que a superfície do eletrodo possui alta estabilidade com uma rápida regeneração de sua superfície.

Figura 26 - Efeito de memória. SWV consecutivos em tampão de fosfato, pH = 8,5; (●) Trip (a) 1,47 ng mL⁻¹ e (b) 3,44 ng mL⁻¹; (◆) Hist (c) 1,1 μg mL⁻¹ e (d) 2,54 μg mL⁻¹. SWV condições: $f = 50$ Hz, $\Delta E_p = 30$ mV, $\Delta E_s = 7$ mV



9.10 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HISTAMINA E TRIPTAMINA EM AMOSTRAS DE VINHOS

A fim de avaliar a aplicação analítica de sensor desenvolvido, o NiPC – CPE foi empregado para a determinação simultânea das aminas biogênicas, Hist e Trip em nove amostras de vinhos tintos e brancos. É importante citar que nenhum tratamento prévio foi necessário para realizar a quantificação das ABs nas amostras, fazendo-se diluições diretamente na célula eletroquímica.

Os sinais voltamétricos para cada amina foram observados em aproximadamente 0,75 V e 1,0 V para Trip e Hist, respectivamente. A faixa de concentração de Trip encontrada nos vinhos foi de 0,02 a 0,71 mg L⁻¹, *CV (%) = 1,35 (n = 3) e de 0,43 a 9,76 mg L⁻¹, *CV (%) = 1,37 (n = 3) para a Hist, os valores de concentração encontrados corroboram com resultados encontrados na literatura para determinação de ABs em vinhos (ROMANO, A. *et al.*, 2012; RAMOS, *et al.*, 2014; JASTRZEBSKA, *et al.*, 2016; PERESTRELOA, *et al.*, 2020; HERRERA-CHACÓN, *et al.*, 2020), as concentrações de ABs encontradas para cada vinho estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Concentrações de Trip e Hist em vinhos determinadas pelo método proposto

Vinhos	(mg L ⁻¹)		CV*(%)	
	Hist	Trip	Hist	Trip
Vinho tinto – Shiraz (2015, Espanha)	9,46	0,02	0,98	1,02
Vinho branco – Mesa (2017, Brasil)	1,71	0,20	0,62	2,38
Vinho tinto – Vitis viniferas (2018, Argentina)	3,31	0,04	1,34	1,03
Vinho tinto – Mesa (2016, França)	2,62	0,06	1,23	0,87
Vinho tinto – Cabernet Sauvignon (2017, Chile)	9,76	0,02	0,78	1,09
Vinho tinto – Tannat / Merlt (2017, Uruguai)	4,12	0,04	1,39	1,63
Vinho tinto – Mesa (2014, Portugal)	0,60	0,14	0,78	1,45
Vinho branco – Vitis viniferas (2018, Portugal)	0,86	0,05	0,70	1,55
Vinho branco – Mesa (2018, Portugal)	0,43	0,71	1,91	1,35

*CV = Coeficiente de variação (n=3)

9.11 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO

Para avaliar a exatidão do método proposto, foi realizado estudo de recuperação em três níveis de concentração, tal estudo foi executado em seis amostras de vinhos usando o método de adição padrão em triplicata. Como pode ser visto na **Tabela 11**, foram obtidas excelentes recuperações, indicando que o método proposto pode ser aplicado com sucesso para determinação simultânea da histamina e da triptamina em vinho sem qualquer pré-tratamento de amostras.

Tabela 11. Estudo de recuperações das ABs em vinhos usando o método proposto

Vinhos	Analitos	Concentração		Recuperação (%)	Médias das recuperações \pm CV* (%)
		Adicionada	Encontrada \pm CV* (%)		
Vinho branco Mesa (2017, Brasil)	Trip (ng mL ⁻¹)	9,83	9,70 \pm 1,03	98,65	99,29 \pm 1,65
		19,65	19,88 \pm 1,20	101,16	
		29,46	28,89 \pm 0,68	98,07	
	Hist (µg mL ⁻¹)	0,73	0,68 \pm 0,57	92,11	
		1,46	1,34 \pm 0,94	91,49	
		2,18	2,12 \pm 0,59	97,31	
Vinho tinto Vitis viniferas 2018, Argentina)	Trip (ng mL ⁻¹)	9,83	8,00 \pm 1,07	81,34	82,65 \pm 1,81
		19,65	16,18 \pm 1,50	82,32	
		29,46	24,83 \pm 0,65	84,28	
	Hist (µg mL ⁻¹)	0,73	0,67 \pm 0,78	91,03	
		1,46	1,32 \pm 1,44	90,23	
		2,18	2,05 \pm 0,90	93,94	
Vinho tinto Tannat/Merlt (2017, Uruguai)	Trip (ng mL ⁻¹)	9,83	8,66 \pm 1,07	88,19	89,89 \pm 2,30
		19,65	17,54 \pm 1,50	89,29	
		29,46	27,16 \pm 0,65	92,20	
	Hist (µg mL ⁻¹)	0,73	0,66 \pm 1,78	90,56	
		1,46	1,36 \pm 1,23	92,80	
		2,18	1,97 \pm 0,89	90,16	
Vinho tinto Mesa (2014, Portugal)	Trip (ng mL ⁻¹)	9,83	9,38 \pm 1,07	95,46	99,26 \pm 3,41
		19,65	20,03 \pm 1,50	101,95	
		29,46	29,56 \pm 0,65	100,38	
	Hist (µg mL ⁻¹)	0,73	0,76 \pm 1,32	103,99	
		1,46	1,52 \pm 0,99	104,55	
		2,18	2,19 \pm 1,23	100,53	
Vinho branco Vitis viniferas (2018, Portugal)	Trip (ng mL ⁻¹)	9,83	9,73 \pm 0,20	99,01	99,37 \pm 0,33
		19,65	19,53 \pm 0,72	99,41	
		29,46	29,36 \pm 0,59	99,67	
	Hist (µg mL ⁻¹)	0,73	0,68 \pm 1,09	92,31	
		1,46	1,35 \pm 0,36	92,40	
		2,18	2,07 \pm 0,60	94,64	
Vinho branco Mesa (2018, Portugal)	Trip (ng mL ⁻¹)	9,83	10,22 \pm 1,07	103,97	101,90 \pm 1,81
		19,65	19,73 \pm 1,50	100,41	
		29,46	29,85 \pm 0,65	101,32	
	Hist (µg mL ⁻¹)	0,73	0,70 \pm 1,02	94,82	
		1,46	1,41 \pm 1,12	96,60	
		2,18	2,13 \pm 0,89	97,45	

*CV = Coeficiente de variação (n=3)

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do NiPC demonstra contribuição significativa para o ganho da corrente de pico na resposta analítica das aminas e consequentemente, aumento da sensibilidade do método proposto. Através dos estudos realizados observou-se que a onda de oxidação eletrocatalítica em aproximadamente 0,75 V para Trip e 1,0 V para Hist, obteve maior sensibilidade em pH 8,5 utilizando a SWV. Além das excelentes respostas lineares para ambas as aminas sobre o NiPC – CPE em baixas concentrações, o sensor proposto apresenta alta seletividade contribuindo para uma maior precisão na determinação dessas aminas.

O método desenvolvido foi utilizado para quantificar simultaneamente a Trip e a Hist com alta precisão numa faixa de 0,02 a 0,71 mg L⁻¹ para a e 0,43 a 9,76 mg L⁻¹ para a Hist, obtendo baixos LOD (Trip = 0,168 ng mL⁻¹ e Hist = 0,038 µg mL⁻¹) e LOQ (Trip = 0,509 ng mL⁻¹ e Hist = 0,115 µg mL⁻¹) além de excelentes valores de recuperação.



Capítulo 5

Conclusões

11 CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho demonstraram as excelentes propriedades catalíticas das MPCs quando utilizadas como mediadores de elétrons. Tais investigações mostraram que esses complexos possibilitam, e até mesmo tornam possíveis estudos eletroquímicos para quantificar espécies químicas de diferentes classes em matrizes que apresentam alto grau de complexidade. O uso de sensores modificados com esses complexos viabilizou a determinação voltamétrica de espécies químicas presentes em vinhos, tais como TA e ABs com baixos LOD, LOQ, reprodutibilidade dos dados e sem apresentar qualquer efeito de memória entre as medidas.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a potencialidade do eletrodo de pasta de carbono modificado com CoPC para determinação do TA, comportamento que não foi observado para as outras PCs utilizadas nas investigações, comprovando que o cobalto é responsável por mediar a reação de oxidação eletrocatalítica do TA para em seguida quantificar este ácido em amostras de vinho utilizando a SWV associada a calibração de segunda ordem.

A segunda etapa deste trabalho consiste no desenvolvimento de um novo método para estudar a oxidação eletrocatalítica da Trip e Hist e a determinação simultânea utilizando MPCs – CPE, onde foi observado que houve um ganho expressivo na corrente de pico quando utilizou a NiPC, o que conferiu ao método baixos LOD e LOQ, além de dispensar qualquer tratamento prévio nas amostras analisadas.

REFERÊNCIAS

- AGYEMAN, A. O. Adsorption studies and selective determination of epinephrine at glycerol-clay modified glassy carbon electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 12, n.10, p. 9601–9618, 2017.
- AHMADVAND, M. *et al.* Systematic study on the effect of noise and shift on multivariate figures of merit of second-order calibration algorithms. **Analytica Chimica Acta**, v. 952, p. 18–31, 2017.
- ALANÓN, M. E.; PÉREZ-COELLO, M. S.; MARINA, M. L. Wine science in the metabolomics. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1–20, 2015.
- AMIGO, J. M.; MARINI, F. **Multiway Methods**. Data Handling in Science and Technology, Elsevier, v. 28, p. 265 – 313, 2013.
- ARANCIBIA, J. A. *et al.* A review on second- and third-order multivariate calibration applied to chromatographic data. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 10, p. 22–30, 2012.
- ARICI, M. *et al.* Electrochemical and spectroelectrochemical characterization of newly synthesized manganese, cobalt, iron and copper phthalocyanines. **Electrochimica Acta**, v. 87, p. 554–566, 2013.
- Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). **Official methods of analysis**. 15^a ed. Washington: DC, 1990.
- BARD, A. *et al.* **Electrochemical Methods Fundamentals and Applications**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2a ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994.
- BARD, A. J.; INZELT, G.; SCHOLZ, F. **Electrochemical Dictionary**. Austin: Springer, 2008.
- BARTOWSKY, E. J.; STOCKLEY, C. S. Histamine in Australian wines - A survey between 1982 and 2009. **Annals of Microbiology**, n. 61, v. 1, p. 167–172, 2011.
- BHARGAVI, M. *et al.* Chemical Development of electrochemical biosensor with ceria – PANI core – shell nano-interface for the detection of histamine. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 199, p. 330–338, 2014.
- BINDON, K. *et al.* Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 1. Grape and wine chemistry. **Food Chemistry**, v. 138 p. 1696–1705, 2013.

- BORSOS, K.; INZELT, G. Electrochemical and nanogravimetric studies of poly (copper phthalocyanine) microparticles immobilized on gold in aqueous solutions. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, p. 2565–2577, 2015.
- BRERETON, R. G. **Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry**. **Analyst**, v. 125, p. 2125–2154, 2000.
- BRERETON, R. G. **Pattern recognition in chemometrics: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 149, p. 90–96, 2015.
- BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica Princípios, Métodos e Aplicações**. 1ª ed. Coimbra: Livraria Almeida, 1993.
- BRO, R. Multivariate calibration: What is in chemometrics for the analytical chemistry **Analytica Chimica Acta**, v. 500, p. 185–194, 2003.
- BRO, R. *et al.* Multi-way models for sensory profiling data. **Journal of Chemometrics**, v. 22, p. 36–45, 2008.
- BROWN, M. D.; SCHOENFISCH, M. H. Catalytic selectivity of metallophthalocyanines for electrochemical nitric oxide sensing. **Electrochimica Acta**, v. 273, p. 98–104, 2018.
- BROWN, R. J. C.; KUCERNAK, A. R. The electrochemistry of platinum phthalocyanine microcrystals - III. Electrochemical behaviour in aqueous electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 46, p. 2573–2582, 2001.
- CAI, Z. Y. *et al.* Electrochemical behavior of tartaric acid at CuGeO₃ nanowire modified glassy carbon electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, p. 2243–2249, 2012.
- CARO, C. A.; ZAGAL, J. H.; BEDIQUI, F. Electrocatalytic Activity of Substituted Metallophthalocyanines Adsorbed on Vitreous Carbon Electrode for Nitric Oxide Oxidation. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 150 p. E95-E103, 2003.
- CAVAZZUTI, M. **Optimization methods: From theory to design**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013.
- CHILLAWAR, R. R.; TADI, K. K.; MOTGHARE, V. R. Voltammetric Techniques at Chemically Modified Electrodes. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, p. 399–418, 2015.
- COSTA, D. J. E. *et al.* Talanta Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry. **Talanta**, v. 154, p. 134–140, 2016.

LUCENA, N. C. *et al.* Layer-by-layer composite film of nickel phthalocyanine and montmorillonite clay for synergistic effect on electrochemical detection of dopamine. **Applied Surface Science**, v. 436, p. 957–966, 2018.

DEGEFU, H. *et al.* Lignin modified glassy carbon electrode for the electrochemical determination of histamine in human urine and wine samples. **Electrochimica Acta**, v. 121, p. 307–314, 2014.

DEON, M. *et al.* Mesoporous silica xerogel modified with bridged ionic silsesquioxane used to immobilize copper tetrasulfonated phthalocyanine applied to electrochemical determination of dopamine. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, p. 2095–2105, 2015.

DEVASENATHIPATHY, R. *et al.* An Amperometric Biological Toxic Hydrazine Sensor Based on Multiwalled Carbon Nanotubes and Iron Tetrasulfonated Phthalocyanine Composite Modified Electrode. **Electroanalysis**, v. 27, p. 1-9, 2015.

DIEZ, N. M. *et al.* Second-order advantage maintenance with voltammetric data modeling for quantitation of ethiofencarb in the presence of interferences. **Talanta**, v. 132, p. 851–856, 2015.

O'DONOGHUE, C. S. J. N. O.; SHUMBA, M.; NYOKONG, T. Electrode Modification through Click Chemistry Using Ni and Co Alkyne Phthalocyanines for Electrocatalytic Detection of Hydrazine. **Electroanalysis** v. 29, p. 1731–1740, 2017.

EILERS, P. H. C.; CURRIE, I. D.; DURBÁN, M. Fast and compact smoothing on large multidimensional grids. **Computational Statistics and Data Analysis**, v. 50, p. 61–76, 2006.

ESCANDAR, G. M., *et al.* Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 806, p. 8–26, 2014.

ESCANDAR, G. M. *et al.* Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 752–765, 2007.

FAGAN-MURPHY, A.; ALLEN, M. C.; PATEL, B. A. Electrochimica Acta Chemically modified multiwall carbon nanotube composite electrodes: An assessment of fabrication strategies. **Electrochimica Acta**, v. 152, p. 249–254, 2015.

FERNANDES, E. N.; REIS, B. F. Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process. **Analytica Chimica Acta**, v. 557, p. 380–386, 2006.

FLORES, P.; HELLÍN, P.; FENOLL, J. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1049–1054, 2012.

GETO, A.; TESSEMA, M.; ADMASSIE, S. Determination of histamine in fish muscle at multi-walled carbon nanotubes coated conducting polymer modified glassy carbon electrode. **Synthetic Metals**, v. 191, p. 135–140, 2014.

GHOLIVAND, M. B. *et al.* Combination of electrochemistry with chemometrics to introduce an efficient analytical method for simultaneous quantification of five opium alkaloids in complex matrices. **Talanta**, v. 131, p. 26–37, 2015.

GÖK, A. *et al.* Synthesis, characterization and electrochemical properties of tetra 7-oxy-3-biphenylcoumarin substituted metal-free, zinc(II), cobalt(II) and indium(III) phthalocyanines. **Dyes and Pigments**, v. 133, p. 311–323, 2016.

GOLUBENKO, A. M.; NIKONOROV, V. V.; NIKITINA, T. G. Determination of hydroxycarboxylic acids in food products by capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 67, p. 778–782, 2012.

GOWDA, J. I.; NANDIBEWOOR, S. T. Electrochemical behavior of paclitaxel and its determination at glassy carbon electrode. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 42–49, 2014.

GUMPU, M. B. *et al.* Development of electrochemical biosensor with ceria-PANI core-shell nano-interface for the detection of histamine. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 199, p. 330–338, 2014.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

BSC, H. S. *et al.* What's in wine? A clinician's perspective. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 29, p. 79–106, 2019.

HELMUT, G.; WILLIAMS, A. **Handbook of Analytical Techniques**. Alemanha: Wiley-VCH, 2001.

HERRERA-CHACÓN, A.; DINÇ-ZOR, Ş.; VALLE, M. Integrating molecularly imprinted polymer beads in graphite-epoxy electrodes for the voltammetric biosensing of histamine in wines. **Talanta**, v. 208, p. 120–348, 2020.

HOLANDA, L. F. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine modified electrode for electroanalytical determination of acetaminophen. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 772, p. 9–16, 2016.

HAALAND, D. M.; THOMAS, E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 1193–202, 1988.

HUAYHUAS-CHIPANA, B. C. *et al.* Modified screen-printed electrode for the FIA-amperometric determination of 2-nitro-*p*-phenylenediamine. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 92–97, 2017.

IORDACHE, A. *et al.* Histamine detection using functionalized porphyrin as electrochemical mediator. Detection de l'histamine par l'utilisation d'une porphyrine fonctionnalisée comme médiateur chimique. **Comptes rendus - Chimie**, v. 21, p. 270–276, 2018.

IVANOVA-PETROPULOS. *et al.* Fast determination of lactic, succinic, malic, tartaric, shikimic, and citric acids in red Vranec wines by CZE-ESI-QTOF-MS. **Electrophoresis**, v. 39, p. 1597–1605, 2018.

JACKSON, R. S. **Wine Science: principles and applications**: 5^a ed. Academic Press, 2020.

JAHANBANI, S.; BENVIDI, A. Comparison of two fabricated aptasensors based on modified carbon paste/oleic acid and magnetic bar carbon paste/Fe₃O₄ oleic acid nanoparticle electrodes for tetracycline detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 553–562, 2016.

JALALVAND, A. R.; GHOLIVAND, M. B.; GOICOECHEA, H. C. Multidimensional voltammetry: Four-way multivariate calibration with third-order differential pulse voltammetric data for multi-analyte quantification in the presence of uncalibrated interferences. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 148, p. 60–71, 2015.

JALALVAND, A. R. *et al.* MATLAB in electrochemistry: A review. **Talanta**, v. 194, p. 205–225, 2019.

JEONG, J. *et al.* Photophysical, electrochemical, thermal and aggregation properties of new metal phthalocyanines. **Journal of Molecular Structure**, v. 1147, p. 469–479, 2017.

JERKOVIĆ, A. *et al.* Development of a cobalt(II)phthalocyanine- MWCNT modified carbon paste electrode for the detection of polyunsaturated fatty acids. **Analytica Chimica Acta**, v. 1038, p. 52–58, 2018.

KACKER, R. N.; LAGERGREN, E. S.; FILLIBEN, J. J. Taguchi's orthogonal arrays are classical designs of experiments. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 96, p. 577, 1991.

KARUPPIAH, C. *et al.* Fabrication of Nickel Tetrasulfonated Phthalocyanine Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes on Activated Glassy Carbon Electrode for the Detection of Dopamine, **Electroanalysis**, v. 27, p. 485–493, 2015.

KONTOGIANNOPOULOS, K. N.; PATSIOS, S. I.; KARABELAS, A. J. Tartaric acid recovery from winery lees using cation exchange resin: Optimization by Response Surface Methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 165, p. 32–41, 2016.

KOOS, J.; STADEN, F. Van. Application of phthalocyanines in flow-and sequential-injection analysis and micro fluidics systems: A review. **Talanta**, v. 139, p. 75–88, 2015.

KOŚCIELNIAK, P.; WIECZOREK, M. Univariate analytical calibration methods and procedures. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 944, p. 14–28, 2016.

KRITSUNANKUL, O.; PRAMOTE, B.; JAKMUNEE, J. Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine. **Talanta**, v. 79, p. 1042–1049, 2009.

KURT, O. *et al.* Photophysical and electrochemical properties of novel hexadeca-substituted phthalocyanines bearing naphthoxy groups. **Dyes and Pigments Synthesis**, v. 137, p. 236–243, 2017.

L'HER, M.; PONDAVEN, A. **Electrochemistry of Phthalocyanines: The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: Spectroscopic and Electrochemical Characterization**. Elsevier Ltd. 2003.

LI, X. *et al.* Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 379, p. 147-160, 2017

LOMAX, S. Q. Phthalocyanine and quinacridone pigments: their history, properties and use, p. 19–30, 2005.

LOURENÇO, Anabel Santos. **Determinação voltamétrica de ácido tartárico / íon tartarato por oxidação eletrocatalítica em eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

MAFATLE, T. J.; NYOKONG, T. Electrocatalytic oxidation of cysteine by molybdenum (V) phthalocyanine complexes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 408, p. 213–218, 1996.

MAGHSOODLOO, S. *et al.* Strengths and limitations of taguchi's contributions to quality, manufacturing, and process engineering, v. 23, p. 73-126, 2004.

MANETTA, A. C. *et al.* Evaluation of biogenic amines in wine: Determination by an improved HPLC-PDA method. **Food Control**, v. 62, p. 351–356, 2016.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, v. 38, p. 1175–1188, 2005.

- MEENAKSHI, S. *et al.* Enhanced amperometric detection of metronidazole in drug formulations and urine samples based on chitosan protected tetrasulfonated copper phthalocyanine thin-film modified glassy carbon electrode. **Materials Science & Engineering C**, v. 59, p. 136–144, 2016.
- MILHEIRO, J. *et al.* A simple dispersive solid phase extraction clean-up / concentration method for selective and sensitive quantification of biogenic amines in wines using benzoyl chloride derivatisation. **Food Chemistry**, v. 274, p. 110–117, 2019.
- MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Technometrics, 6^a ed. Pearson, 2010
- MONTEIRO, E. *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 60–167, 2018.
- NAS, A. *et al.* Substituted cobalt, iron and manganese phthalocyanines: Synthesis and electrochemical analysis. **Inorganica Chimica Acta**, v. 466, p. 86–92, 2017.
- NASCIMENTO, R. F. *et al.* Flow-injection electrochemical determination of citric acid using a cobalt (II)-phthalocyanine modified carbon paste electrode. **Talanta**, v. 105, p. 354–359, 2013.
- NIELSEN, N. P. V.; CARSTENSEN, J. M.; SMEDSGAARD, J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. **Journal of Chromatography A**, v. 805, p. 17–35, 1998.
- NÚÑEZ, C.; ARANCIBIA, V., TRIVINO, J. J. A new strategy for the modification of a carbon paste electrode with carrageenan hydrogel for a sensitive and selective determination of arsenic in natural waters. **Talanta**, v. 187, p. 259–264, 2018.
- ÖHMAN, J.; GELADI, P.; WOLD, S. Residual bilinearization. Part 1: Theory and algorithms. **Journal of Chemometrics**, v. 4, p. 79–90, 1990.
- OLIVEIRA, S. M. *et al.* Simultaneous determination of tartaric acid and potassium in wines using a multicommuted flow system with dialysis. **Talanta**, v. 81, p. 1735–1741, 2010.
- OLIVIERI, A. C. Recent advances in analytical calibration with multi-way data. **Analytical Methods**, v. 4, p. 1876–1886, 2012.
- OLIVIERI, A. C. Analytical figures of merit: From univariate to multiway calibration. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 5358–5378, 2014.
- OLIVIERI A. C.; S. BORTOLATO, F.; ALLEGRINI. **Figures of Merit in Multivariate Calibration**. In: L. M. C. Buydens, P. J. Schoenmakers. *Data Handling in Science and Technology*. Elsevier, p. 541–575, 2015.

OLIVIERI, A. C. *et al.* Unfolded and Multiway Partial Least-Squares with Residual Multilinearization: Fundamentals. **Data Handling in Science and Technology**, v. 29, p. 347–363, 2015.

OLIVIERI, A. C.; WU, H. L.; YU, R. Q. MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 96, p. 246–251, 2009.

ÖMEROĞLU, I.; Biyiklioglu, Z. Synthesis and electrochemistry of phthalocyanines bearing [(3,4-dimethoxybenzyl)oxy] groups. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 39, p. 347–358, 2015.

ÖZÇEŞMECI, I. *et al.* Synthesis, electrochemical and spectroelectrochemical properties of phthalocyanines having extended π -electrons conjugation. **Electrochimica Acta**, v. 89, p. 270–277, 2013.

ÖZGÜL, G. *et al.* Synthesis, characterization and comparative electrochemistry of beta and alpha tetra-[4-oxy-3-methoxybenzoicacid]-substituted Zn(II), Co(II) and Cu(II) phthalocyanines. **Polyhedron**, v. 85, p. 181–189, 2015.

OZKAN, S. A.; KAUFFMANN, J-M., ZUMAN, P. *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. New York, 2015.

PAPAGEORGIU, M. *et al.* Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 128–142, 2018.

PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação Voltamétrica de 4-Clorofenol Sobre o Eletrodo de Diamante Dopado com Boro Utilizando a Voltametria de Onda Quadrada. **Quimica Nova**, v. 26, p. 844–849, 2003.

PÉREZ-RUIZ, T. *et al.* High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, p. 57–64, 2004.

PERRIN, D. D.; DEMPSEY, B.; SERJEANT, E. P. **pKa Prediction for Organic Acids and Bases**. London: Chapman and Hall, 1981.

RAMOS, R. M.; VALENTE, I. M.; RODRIGUES, J. A. Analysis of biogenic amines in wines by salting-out assisted liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Talanta**, v. 124, p. 146–151, 2014.

RAPOSO, R. *et al.* (2018). Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots: Impact on the wine quality. **Food Chemistry**, v. 243, p. 453–460, 2014.

RAVICHANDRAN, K.; BALDWIN, R. P. Chemically Modified Carbon Paste Electrodes, **Journal Electroanal Chemistry**, v. 126, p. 293–300, 1981.

RIO, B.; *et al.* The biogenic amine tryptamine, unlike β -phenylethylamine, shows in vitro cytotoxicity at concentrations that have been found in foods. **Food Chemistry**, v. 331, p. 127-303, 2020.

ROMANO, A. *et al.* Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/densitometry. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1392–1396, 2012.

SARKADI, L. S. Biogenic Amines in Fermented Foods and Health Implications. *In*: FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E. (org.). **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**. Nikki Levy, 2017, p. 625-651.

SHAHROKHIAN, S.; ASADIAN, E. Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, acetaminophen and isoniazid using thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 666–672, 2010.

SHARMA, S. *et al.* Biosensors and Bioelectronics A review on electrochemical detection of serotonin based on surface modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 107, p. 76–93, 2018.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M., F. J. HOLLER, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SMILDE, A. K.; BRO, R.; GELAD, P. Multi-way analysis With Applications in the chemical sciences. Amsterdam: John Wiley & Sons, 2004.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. **Journal of Clinical Lab. Analysis**, v. 11, p. 287–313, 1997.

SONG, Y.; SONG, Y.; XU, J. Electrochemical determination of tartaric acid at nano gold/nano carbon modified glassy carbon electrode. **Russ. J. Phys. Chem. A**, v. 86, p. 1458–1464, 2012.

SOUFLEROS, E. H. *et al.* Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. **Food Chemistry**, v. 101, p. 704–716, 2007.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81–89, 2003.

SOUZA, S. C. *et al.* Bioactive Amines in Brazilian Wines: Types, Levels and Correlation with Physico-Chemical Parameters, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 53–62, 2005.

STOJANOVIĆ, Z. S. *et al.* SWCNT-modified carbon paste electrode as an electrochemical sensor for histamine determination in alcoholic beverages. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 2701–2710, 2016.

SVANCARA, I. *et al.* Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using a carbon paste electrode modified with multiwalled carbon nanotubes, ionic liquid, and palladium nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 181, p. 1999–2008, 2001.

TICIANELLI, E. A.; GONZÁLEZ, E. R. **Eletroquímica, Princípios e aplicações**. 2^a ed., São Paulo: Edusp, 2005.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 40, p. 817–853, 2007.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**, 2^a ed., New York: John Wiley & Sons, Inc, 2000.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3^a ed. New Jersey: John Wiley and Sons Ltd., 2006.

ZAGAL, J. H. *et al.* Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 2755–2791, 2010.

ZAIB, M. *et al.* Electrochemical determination of inorganic mercury and arsenic-A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 895–908, 2015.

ZANONI, M. V. B. *et al.* Panorama da eletroquímica e eletroanalítica no Brasil. **Quimica Nova**, v. 40, p. 663–669, 2017.

ZERAVIK, J. *et al.* Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. **Food Chemistry**, v. 194, p. 432–440, 2016.

ZHONG, J. *et al.* Electrochimica Acta Highly active Pt nanoparticles on nickel phthalocyanine functionalized graphene nanosheets for methanol electrooxidation. **Electrochimica Acta**, v. 113, p. 653–660, 2013.

ZOSKI, C. G. **Handbook of Electrochemistry**: 1^a ed. Novo México: Editora Elsevier, 2006.

APÊNDICE A – RESULTADOS MCR – ALS

Tabela A – 1. Figuras de mérito

Nº de componentes	SEN	γ	Desvio padrão	Seletividade	
04	$1,1 \times 10^{-7}$	1,08	1,07	0,60	
LOQ	LOD	Resíduo	R ²	RMSEP	REP
12,69	6,51	$9,53 \times 10^{-8}$	0,999	2,63	4,78

Tabela A – 2. Estudo de recuperações do TA em vinhos

Vinhos	Concentração de TA (mg L ⁻¹)		
	Adicionada	Encontrada $\pm CV^*(\%)$	Recuperado (%)
Vinho branco	-	$3,84 \pm 1,03$	-
	3,00	$3,04 \pm 1,23$	101,17
	7,50	$7,34 \pm 1,07$	97,88
	13,50	$10,98 \pm 0,56$	81,30
Vinho tinto	-	$1,24 \pm 0,23$	-
	3,00	$2,43 \pm 1,90$	81,11
	7,50	$7,65 \pm 0,56$	101,91
	13,50	$15,93 \pm 0,15$	117,92